

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I

**INICIACIÓN DE LA REPLICACIÓN DEL PLÁSMIDO
PROMISCUO pMV158: INTERACCIONES
MACROMOLECULARES EN EL ORIGEN DE
REPLICACIÓN**

TESIS DOCTORAL

José Ángel Ruiz Masó

Madrid, 2007

**INICIACIÓN DE LA REPLICACIÓN DEL PLÁSMIDO
PROMISCUO pMV158: INTERACCIONES
MACROMOLECULARES EN EL ORIGEN DE
REPLICACIÓN**

TESIS DOCTORAL

José Ángel Ruiz Masó
Tesis doctoral dirigida por: Dra. Gloria del Solar Dongil
Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC

A mi familia

La realización de esta Tesis doctoral ha supuesto un reto importante y constituye mi iniciación al mundo de la Investigación Científica. Por esta razón, y por todos los momentos vividos durante este tiempo, siempre guardaré un buen recuerdo.

Tampoco olvidaré como fueron los comienzos y como, poco a poco, me fui integrando en el grupo hasta sentirme como en casa. Manolo fue el responsable de mi interés por la Biología plasmídica. Fue durante un seminario que impartió en la Facultad de Biología cuando, sorprendido por todos los resultados que nos había enseñado y por el entusiasmo que mostraba por su trabajo, tomé la decisión de intentar trabajar en su grupo. Un poco después conocí a Gloria, que sería mi directora de tesis y que, según tengo entendido, apostó por incorporar algo de diversidad de género al laboratorio. A los dos les debo todo lo que he aprendido en estos años, y les agradezco la confianza que depositaron en mí y todas las oportunidades que me han ofrecido para seguir creciendo como científico. Creo sinceramente que la realización de este trabajo de tesis no hubiera sido posible sin la dirección científica de Gloria. Su forma de trabajar es exigente y meticulosa, y, como consecuencia, el resultado es siempre de alta calidad. Espero seguir su ejemplo y poner en práctica todo lo que he aprendido con ella. Otro aspecto que me gustaría destacar de Manolo y Gloria es su calidad humana, de la cual he disfrutado ampliamente durante estos años.

Durante la realización de este trabajo he sido afortunado de poder participar en numerosas colaboraciones científicas sin las que esta tesis no sería la misma. Me gustaría agradecer a todos los investigadores con los que hemos colaborado su buena disponibilidad y su especial interés en este trabajo. Me gustaría dar las gracias al Prof. Saleem Khan, por acogerme en su laboratorio y por su aportación decisiva en el trabajo de PcrA. Al Prof. Miquel Coll, por su empeño y dedicación en la resolución de la estructura de RepB. A la Dra. Margarita Menéndez, por ofrecerme su tiempo y sus conocimientos en la espectroscopía de proteínas. Al Dr. Rudi Lurz, por su hospitalidad, y por su trabajo en la visualización de los complejos RepB-DNA. Al Dr. Pablo Chacón y al Dr. Oscar Llorca, por su interés en RepB, y por haber dado un impulso definitivo a la resolución de su estructura desde la reconstrucción tridimensional de imágenes.

También me gustaría tener un recuerdo especial para todos los “currantes” que han participado en este trabajo. A Syam le doy las gracias por ser mi amigo y por contagiarme su entusiasmo por la investigación. A Roeland y a Mon, por haber “adoptado” a RepB, y por enseñarme otra forma de ver a las proteínas. A Patri, por su trabajo en la parte “técnica” y en la purificación de PcrA. A Maite, por su trabajo esencial para esta tesis en la purificación de RepB, y por darnos ejemplo a las nuevas generaciones con su esfuerzo y dedicación.

En la realización de esta tesis también han desempeñado un papel importante, muy importante, el resto de personas que componen los grupos de Manolo, Gloria y Paloma. De todos ellos, de los que ya no están y de los que han llegado hace poco, guardo un recuerdo muy especial. No me gustaría destacar a nadie en concreto porque de todos he aprendido y todos han dejado su poso. Sin embargo, sería injusto no tener un agradecimiento especial para los “compañeros” del café. Muchas gracias a todos.

Dos acontecimientos importantes han sucedido durante la realización de esta tesis. El primero fue mi matrimonio con Esther. El segundo, tres años después, el nacimiento de Belén. A ellas les ha tocado vivir la otra parte de la tesis. Sin ellas nada sería posible, nada tendría sentido. Gracias por estar ahí, por entender este difícil mundo de la investigación.

Finalmente no puedo dejar de mencionar a mi familia, a mis padres y a mi hermano. Ahora que soy padre me doy cuenta de la importancia de su trabajo y valoro aún más su esfuerzo. Gracias por darlo todo.

José Ángel

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
1. PLÁSMIDOS BACTERIANOS	1
<i>Definición e importancia biológica</i>	1
<i>Control de la replicación plasmídica</i>	2
<i>Rango de huésped</i>	2
<i>Replicación por el mecanismo tipo theta</i>	3
<i>Replicación por desplazamiento de cadena</i>	7
2. REPLICACIÓN PLASMÍDICA POR EL MECANISMO RC	8
<i>El mecanismo de replicación por círculo rodante</i>	9
<i>Control de la replicación</i>	10
<i>El origen de replicación de doble cadena o dso</i>	11
<i>La organización del dso de pMV158 es única entre los plásmidos RC</i>	12
3. LAS PROTEÍNAS INICIADORAS DE LA REPLICACIÓN DE PLÁSMIDOS RC	14
<i>Las proteínas de la clase Rep</i>	14
<i>La reacción de transferencia de cadena mediada por Rep</i>	17
<i>Estructura del dominio nucleasa de proteínas de las clases Rep y Mob</i>	19
<i>Características e implicaciones de la unión del metal divalente en el centro activo</i>	22
<i>Elementos estructurales implicados en el reconocimiento del DNA</i>	24
4. LA HELICASA PcrA, OTRO COMPONENTE DEL COMPLEJO DE INICIACIÓN DE LA REPLICACIÓN PLASMÍDICA “ROLLING CIRCLE” EN BACTERIAS GRAM-POSITIVAS	27
<i>Las helicasas: definición y clasificación</i>	27
<i>Estructura y mecanismo de actuación de la helicasa PcrA de Bacillus stearothermophilus</i>	29
<i>Dos modelos para explicar el mecanismo helicasa</i>	31
<i>La función de PcrA en bacterias Gram-positivas</i>	34
OBJETIVOS	37
MATERIALES Y MÉTODOS	38
MATERIALES	38
1. MATERIAL BIOLÓGICO: ESTIRPES BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS	38
1.1. <i>Estirpes bacterianas</i>	38
1.2. <i>Plásmidos</i>	38
2. MEDIOS DE CULTIVO	40
2.1. <i>Medio de cultivo para S. pneumoniae</i>	40
2.2. <i>Medio de cultivo para E. coli</i>	40
2.3. <i>Medio de cultivo para S. aureus</i>	40

3. FRAGMENTOS DE DNA Y OLIGONUCLEÓTIDOS	41
3.1. Fragmentos de DNA	41
3.2. Oligonucleótidos	42
4. ENZIMAS	44
5. PRODUCTOS QUÍMICOS Y REACTIVOS	44
6. TAMPONES	44
7. SOPORTE INFORMÁTICO	46
MÉTODOS	48
1. MÉTODOS GENERALES	48
1.1. CRECIMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LAS ESTIRPES BACTERIANAS	48
1.2. PREPARACIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES	48
1.3. PREPARACIONES DE DNA	48
1.3.1. Preparaciones de DNA plasmídico	48
1.3.2. Obtención de fragmentos de DNA	49
1.4. MANIPULACIONES ENZIMÁTICAS DEL DNA	50
1.5. ELUCIÓN Y PURIFICACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS Y FRAGMENTOS DE DNA	50
1.6. SECUENCIACIÓN DEL DNA	51
1.7. ELECTROFORESIS DE DNA	51
1.7.1. Electroforesis en geles de agarosa	51
1.7.2. Electroforesis en geles de PAA	51
1.7.3. Geles de secuenciación	52
1.8. MARCAJE RADIATIVO DEL DNA	52
1.8.1. Marcaje de oligonucleótidos en 5'	52
1.8.2. Marcaje de fragmentos de DNA por PCR	53
1.9. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS	53
1.10. ENSAYOS DE WESTERN-BLOT	53
2. MÉTODOS ESPECÍFICOS	54
2.1. PURIFICACIÓN DE RepB	54
2.2. PURIFICACIÓN DE PcrA	56
2.3. ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE RepB	57
2.3.1. Ensayos de actividad de RepB sobre DNA superenrollado	57
2.3.2. Ensayos de actividad sobre oligonucleótidos monocatenarios	57
2.4. ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE PcrA	58
2.4.1. Actividad ATPasa	58

2.4.2. Actividad helicasa	58
2.4.3. Actividad de desenrollamiento del DNA in vitro	58
2.5. ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES PROTEÍNA-DNA	59
2.5.1. Formación de los complejos RepB-DNA	59
2.5.2. Formación de los complejos PcrA-DNA	59
2.5.3. Análisis de la cooperatividad en la unión de RepB al DNA	59
2.5.4. Análisis de la estabilidad de los complejos RepB-DNA	61
2.5.5. Cálculo de la constante de afinidad relativa de RepB por distintos DNAs	62
2.5.6. Análisis de la curvatura del DNA	62
2.5.7. Ensayos de "footprinting"	63
2.5.7.1. Ensayos de "footprinting" sobre DNA lineal	64
2.5.7.2. Ensayos de "footprinting" sobre DNA superenrollado	64
2.6. ANÁLISIS Y DETECCIÓN DE MOLÉCULAS DE RNA	65
2.7. ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS DE RepB	66
2.7.1. Determinación del espectro de dicroísmo circular de RepB	66
2.7.2. Análisis de la estabilidad térmica de RepB por dicroísmo circular	67
2.7.3. Determinación del espectro de fluorescencia de RepB	67
2.8. DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR DE RepB Y DE SUS PROPIEDADES HIDRODINÁMICAS POR ULTRACENTRIFUGACIÓN ANALÍTICA	68
2.8.1. Equilibrio de sedimentación	68
2.8.2. Velocidad de sedimentación	68
2.9. EXPERIMENTOS DE ENTRECRUZAMIENTO	69
2.9.1. Tratamiento in vitro con BS ³ y DSP de proteína RepB purificada	70
2.9.2. Tratamiento in vivo con BS ³ y reparación de extractos de proteína total de <i>S. pneumoniae</i>	70
2.10. DETECCIÓN Y ANÁLISIS DE LOS COMPLEJOS RepB/DNA POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	71
2.11. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS LIBRES DE CÉLULAS Y REPLICACIÓN IN VITRO DE pT181	71
2.11.1. Preparación de los extractos de replicación	71
2.11.2. Ensayos de replicación in vitro de pT181 en extractos libres de células	71
2.11.3. Ensayos de replicación in vitro de pT181 con DnaE	72
2.12. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ENTRE PcrA Y RepC	72

RESULTADOS

CAPÍTULO 1: INICIACIÓN DE LA REPLICACIÓN DE pMV158: INTERACCIÓN ENTRE LA PROTEÍNA INICIADORA DE LA REPLICACIÓN RepB Y EL ORIGEN DE REPLICACIÓN DE CADENA DOBLE	74
--	----

1. Detección y análisis, mediante ensayos de retardo en gel, de los complejos formados por la unión de RepB al DNA del dso	74
2. Análisis de alta resolución de los contactos entre RepB y el DNA del dso	76
4. Cálculo de la afinidad relativa de RepB por las distintas regiones del dso	80
3. Estabilidad de los complejos RepB-DNA	81
5. Análisis de la curvatura del DNA del dso	83
6. Análisis de los complejos RepB-DNA mediante microscopía electrónica	85
7. Análisis de las interacciones entre RepB y el dso en DNA plasmídico superenrollado	87

CAPÍTULO 2: CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LA PROTEÍNA RepB INICIADORA DE LA REPLICACIÓN DEL PLÁSMIDO pMV158 92

1. Purificación de RepB	92
2. RepB es un hexámero de subunidades idénticas: análisis de las propiedades hidrodinámicas de RepB mediante velocidad y equilibrio de sedimentación	94
3. Estructura secundaria de RepB	95
4. Medida de la estabilidad térmica de RepB por espectroscopía de CD	97
5. El Mn^{2+} es esencial para la actividad catalítica de RepB	100
6. Espectro de emisión de fluorescencia de RepB	105
7. Experimentos de entrecruzamiento: análisis del estado de asociación de RepB in vivo	107
8. Determinación de la estructura tridimensional del hexámero de RepB	109
8.1. Estructura global del hexámero de RepB por cristalografía de rayos X	110
8.2. Reconstrucción tridimensional por microscopía electrónica de RepB y de RepB unida al DNA del locus bind	114
8.2.1. Introducción a la técnica	114
8.2.2. Reconstrucción tridimensional de RepB	115
8.3. Análisis de la estequiometría de la unión entre RepB y el DNA del locus bind	118

CAPÍTULO 3: CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y BIOQUÍMICA DE LA HELICASA PcrA DE *Streptococcus pneumoniae* Y SU FUNCIÓN EN LA REPLICACIÓN DE PLÁSMIDOS RC 120

1. Identificación y análisis de la secuencia del gen pcrA de estreptococo y su contexto genómico en bacterias Gram-positivas	120
2. El gen pcrA de neumococo pertenece a un operón esencial	122
3. Clonaje y purificación de PcrASpn	126
4. La actividad ATPasa de PcrASpn es estimulada por ssDNA	128
5. Interacciones proteína-proteína entre PcrASpn y RepC	128
6. Actividad helicasa y de unión a DNA de PcrASpn	129
7. PcrASpn no puede desenrollar extensivamente el DNA de pT181 cortado por RepC	131
8. La capacidad de His-PcrASpn de promover la replicación in vitro de pT181 es limitada	133

DISCUSIÓN	135
<i>RepB interacciona con dos regiones distantes en el dso</i>	135
<i>La secuencia del dso de los plásmidos de la familia de pMV158</i>	137
<i>La información obtenida del análisis de la interacción de RepB con las dos regiones del dso sugiere la existencia de una interrelación entre los sitios primario y secundario de unión de RepB</i>	140
<i>¿Es el hexámero de RepB la forma activa en replicación?</i>	141
<i>¿Cuál es la región de RepB que interacciona con el DNA del locus bind?</i>	144
<i>La expresión del operon pcrA-radC es esencial para S. pneumoniae</i>	145
<i>La función de PcrA está relacionada con su capacidad de desenrollar determinadas estructuras</i>	147
<i>¿Por qué los plásmidos de la familia de pMV158 han evolucionado generando un sitio de unión de alta afinidad apartado del sitio de corte?</i>	149
CONCLUSIONES	153
BIBLIOGRAFÍA	156
PUBLICACIONES	

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

INTRODUCCIÓN:

Figura 1. Estructura de los intermedios de replicación tempranos correspondientes a los plásmidos que replican por el mecanismo tipo theta o por desplazamiento de cadena	4
Figura 2. Replicones básicos de algunos plásmidos que replican por el mecanismo tipo theta o por desplazamiento de cadena	7
Figura 3. Modelo de la replicación plasmídica RC	10
Figura 4. Esquema del origen de replicación y la región adyacente de los plásmidos RC pMV158 y pT181	12
Figura 5. Organización funcional de plásmidos RC	13
Figura 6. Alineamiento de la secuencia de algunas proteínas iniciadoras Rep de la familia de pMV158	16
Figura 7. Comparación del plegamiento de los dominios RCR de las proteínas de las clases Rep y Mob	20-21
Figura 8. Comparación del plegamiento del dominio endonucleasa de las proteínas de las clases Rep y Mob con el dominio OBD de algunas proteínas virales de replicación	22
Figura 9. Comparación de la conformación del DNA en la estructura de Tral de F y TrwC de R388	25
Figura 10. Interacción de la proteína Rep de AAV-5 con el origen de replicación viral	26
Figura 11. La organización modular de las helicasas de las superfamilias SF1 y SF2	28
Figura 12. Modelo del mecanismo helicasa de PcrA	30
Figura 13. Modelos para el mecanismo helicasa de DNA	32
Figura 14. Estructura de los complejos UvrD-DNA	34

MATERIALES Y MÉTODOS:

Tabla 1. Estirpes bacterianas	38
Tabla 2. Plásmidos	38
Tabla 3. Fragmentos de DNA	41
Tabla 4. Oligonucleótidos	43
Tabla 5. Descripción de los tampones utilizados y su aplicación	44
Tabla 6.	60

RESULTADOS:

CAPÍTULO 1:

Figura 15. El origen de replicación de doble cadena de pMV158 y su interacción con RepB	75-76
Figura 16. Identificación de los contactos de RepB con el <i>dso</i> entero (A) o con el locus <i>nic</i> (B)	77
Figura 17. Identificación de los contactos entre RepB y el locus <i>bind</i>	79
Figura 18. Estabilidad de los complejos RepB- <i>bind</i>	81
Figura 19. Afinidad relativa de RepB por diferentes secuencias de DNA	82
Figura 20. Caracterización de la curvatura del DNA inducida por RepB mediante ensayos de permutación circular	84
Tabla 7. Curvatura del DNA inducida por Rep	85
Figura 21. Microscopía electrónica de los complejos RepB-DNA	86
Tabla 8. Estadística de las medidas de la longitud del DNA	87
Figura 22. "Footprinting" con DMS de RepB unida al locus <i>nic</i> sobre DNA superenrollado	88
Figura 23. "Footprinting" con KMnO ₄ de RepB unida al locus <i>nic</i> sobre DNA superenrollado	90
Figura 24. Esquema donde se muestran las zonas de la cadena no-codificante del <i>dso</i> de pMV158 cuya sensibilidad al DMS o al KMnO ₄ está modificada tras la unión de RepB al locus <i>nic</i>	91

CAPÍTULO 2:

Figura 25. Características de la región de replicación y control de pMV158 y construcción de un plásmido para la purificación de RepB	93
Figura 26. Perfil de ultracentrifugación analítica de RepB	95
Figura 27. Análisis de la estructura secundaria de RepB	96
Figura 28. Análisis de la estabilidad térmica de RepB	97-98
Figura 29. Cambios en la estructura terciaria de RepB asociados a un aumento de la temperatura	99
Figura 30. Curvas de transición térmica generadas por la variación de la elipticidad a 218 nm (●) y a 282 nm (○) en el rango de temperaturas indicado	99
Figura 31. Determinación de la masa molecular de RepB después del calentamiento a diferentes temperaturas	100

Figura 32. Ensayos de actividad de corte y corte/cierre de RepB sobre DNA SC de pMV158	101
Figura 33. Inactivación de RepB por calentamiento a 45 °C	102
Figura 34. (A) Análisis de la estabilidad térmica de RepB en presencia de metales divalentes. (B) Protección mediada por Mn ²⁺ frente a la inactivación térmica de RepB	103
Figura 35. (A) Actividad de corte de RepB sobre un oligo monocatenario 23-mer. (B) Actividad de corte de RepB a 37 °C y una relación molar de proteína:oligo 23-mer de 1,5:1	104
Figura 36. Emisión de fluorescencia de RepB	106
Figura 37. Experimentos de entrecruzamiento de RepB <i>in vivo</i>	108
Figura 38. Estructura tridimensional de RepB por cristalografía de rayos X	110- 111
Figura 39. (A) Estructura del centro activo de RepB. (B) Comparación del plegamiento del dominio endonucleasa de RepB con las proteínas de las clases Rep y Mob	112- 114
Figura 40. Reconstrucción tridimensional por ME de RepB y de RepB unida a DNA	116
Figura 41. Análisis de la estequiometría de la unión de RepB al locus <i>bind</i>	118

CAPÍTULO 3:

Figura 42. Análisis comparativo del contexto genómico del gen <i>pcrA</i> en varias bacterias Gram-positivas	121
Figura 43. Análisis transcripcional del operón <i>pcrA-radC</i> en <i>S. pneumoniae</i>	122
Figura 44. Estrategia para la interrupción del gen <i>pcrA</i>	124
Figura 45. Sobreproducción y purificación de PcrASpn	126
Figura 46. Actividad ATPasa de His ₆ -PcrASpn	128
Figura 47. Análisis de la interacción entre His ₆ -PcrASpn y RepC	129
Figura 48. Actividad helicasa y de unión a DNA de la helicasa PcrASpn	130
Figura 49. Actividad de PcrASpn en el desenrollamiento de DNA plasmídico	132
Figura 50. Replicación <i>in vitro</i> de pT181	134

DISCUSIÓN:

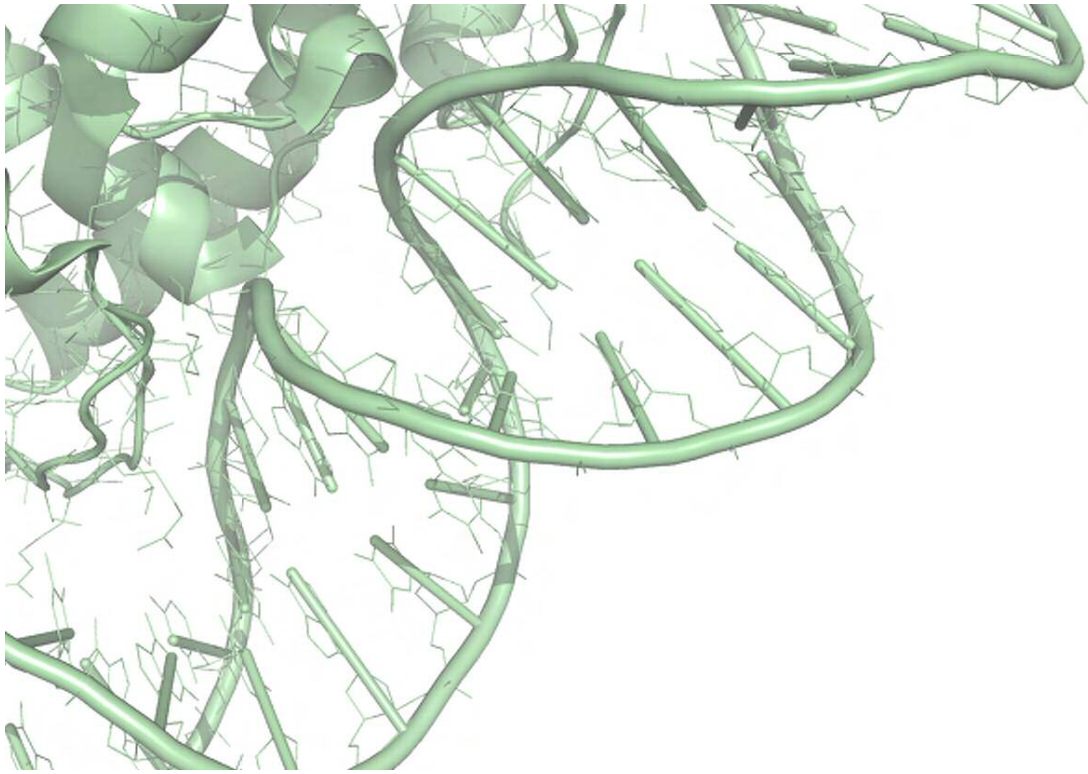
Figura 51. Alineamiento de la secuencia del <i>dso</i> de los plásmidos de la familia de pMV158	138
Figura 52. Conservación del <i>dso</i> en los plásmidos de la familia de pMV158	141

Figura 53. Posibles motivos de unión al DNA del locus <i>bind</i> en el hexámero de RepB	145
Figura 54. Experimentos de interrupción de la traducción de <i>pcrA</i> mediante RNA antisentido	148-149
Figura 55. Modelo de la estructura 3D de PcrAS _{pn}	152

Lista de abreviaturas:

A	absorbancia
Ap o Amp	ampicilina
ATP	adenosina 5'-trifosfato
BrEt	bromuro de etidio
BS ³	Bis(sulfosuccinimidil) suberato
BSA	seroalbumina bovina
cAMP	adenosina-5'-3'-monofosfato (AMP cíclico)
Ci	curios
cDNA	DNA codificante
Cm	cloramfenicol
cm	centímetros
cpm	cuentas por minuto
CTP	citidina 5'-trifosfato
Da	dalton(s)
dATP	desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	desoxicitidina 5'-trifosfato
dGTP	desoxiguanosina 5'-trifosfato
DMS	dimetilsulfato
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxinucleótido 5'-trifosfato
DOC	deoxicolato
DTT	ditiotreitol
dTTP	desoxitimidina 5'-trifosfato
DSP	ditiois(succinimidilpropionato)
EDTA	N,N,N',N'-etilendiamino tetraacetato disódico
EGTA	ácido etilenglicol-bis-(β-aminoetil éter) N-N'-tetraacético
EG	etilenglicol
Em	eritromicina
EMSA	ensayo de cambio de movilidad electroforética (Electrophoretic Mobility Shift Assay)
erg	ergios
GTP	guanosina 5'-trifosfato
Hepes	ácido N-2-hidroxietilpiperacina-N'-2-etanosulfónico
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
kb	kilobases
Km	kanamicina
M	molar
MBP	proteína de unión a maltosa
mg	miligramos
Mg (OAc) ₂	acetato de magnesio
min	minutos
mRNA	RNA mensajero
NAD	nicotinamida-adenina dinucleótido
nm	nanómetros
nt	nucleótido
oligo	oligo-desoxirribonucleótido
o/n	durante la noche (over/night)
ORF	pauta abierta de lectura (Open Reading Frame)
P	fosfato
PAA	poliacrilamida
pb	par de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

PEI	polietilenimina
PSA	persulfato amónico
RNA	ácido ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato sódico
t.a.	temperatura ambiente
Tea	trietanolamina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilen-diamina
Tris	trihidroximetil-amino-metano
U	unidades
UTP	uridina 5'-trifosfato
UV	ultravioleta
V	voltios
v/v	volumen/volumen



INTRODUCCIÓN

1. PLÁSMIDOS BACTERIANOS.

Definición e importancia biológica.

Los plásmidos bacterianos son moléculas extracromosómicas de DNA bicatenario (dsDNA) que son capaces de replicar de forma autónoma y controlada. Los plásmidos bacterianos están implicados en la diseminación de información en el medio ambiente gracias a su capacidad para introducirse en nuevos huéspedes mediante una variedad de mecanismos, por lo que podemos considerar que constituyen un reservorio de DNA extracromosómico compartido entre diferentes poblaciones. La gran cantidad de información genética contenida en los plásmidos, su impacto en las comunidades microbianas, y el potencial de estos elementos para actuar como vectores de clonaje naturales, ha estimulado la investigación en la biología plasmídica, no sólo a nivel fundamental, sino también desde el punto de vista clínico, biotecnológico y medioambiental.

Para desempeñar su función, los plásmidos se han provisto de diferentes estrategias para su replicación que explican tres propiedades plasmídicas esenciales: control del número de copias, dependencia y rango de huésped, y respuesta a condiciones ambientales. Los plásmidos naturales varían considerablemente en tamaño (desde unos cientos de pares de bases [bp] hasta cientos de kilobases [kb]), en rango de bacterias huéspedes (desde una a varias especies), y en la variedad de rasgos genéticos que confieren a sus hospedadores (resistencia a antibióticos o a metales pesados, factores de patogenicidad, degradación de compuestos aromáticos, resistencia a radiación UV, etc.). Con independencia del tamaño del plásmido, los genes y las secuencias necesarias para la replicación plasmídica y su control están agrupados en una región denominada replicón básico. Normalmente, el replicón básico no supera las 3 kb y está formado por: (i) un origen de replicación (*ori*); (ii) genes *cop/inc* implicados en el control de la iniciación de la replicación y, en la mayoría de los casos, (iii) uno o varios genes *rep* que codifican proteínas Rep necesarias para iniciar la replicación, y que a menudo participan en su propia regulación.

A pesar del conocimiento acumulado sobre la replicación plasmídica, sólo se han estudiado con detalle un número limitado de replicones. Los plásmidos circulares utilizan dos estrategias generales para facilitar la carga y el ensamblaje del complejo multiproteico o replisoma en el origen de replicación. Estas estrategias suponen ya sea la apertura de la doble cadena de DNA en una región del origen rica en bases A + T (replicación tipo theta), o la introducción de un corte específico de secuencia y de cadena que relaja el DNA y genera un extremo 3'-OH que se usa como cebador para iniciar la replicación [replicación tipo círculo rodante (RCR)]. Nuestro conocimiento sobre la replicación tipo theta proviene del estudio de plásmidos aislados, en su mayoría, de bacterias Gram-negativas, como ColE1, pSC101, P1, F, R6K, R1, RK2/RP4, o del plásmido RSF1010 (que usa el mecanismo relacionado de replicación por desplazamiento de cadena). Sin embargo, la replicación por círculo rodante (descrita inicialmente para bacteriófagos de cadena sencilla) se ha observado en un gran número de plásmidos pequeños y con múltiples copias aislados de bacterias

Gram-positivas. Estudios recientes han identificado plásmidos que replican por círculo rodante en bacterias Gram-negativas y en Arquea, así como plásmidos tipo theta en bacterias Gram-positivas, lo que sugiere una distribución más amplia de los dos mecanismos de replicación que la previamente asumida (del Solar *et al.*, 1993a; del Solar *et al.*, 1998).

Control de la replicación plasmídica.

La característica que mejor define a los plásmidos es que replican de manera autónoma y autorregulada. Un plásmido concreto, en un determinado huésped bajo unas condiciones de crecimiento definidas, se mantiene con un número de copias característico. Esto implica que, en términos generales, antes de cada división celular el número de copias del plásmido debe duplicarse. Los plásmidos son capaces de detectar y corregir las fluctuaciones con respecto a su número característico de copias. De las tres etapas de la replicación (iniciación, elongación y terminación), es en la iniciación cuando todos los plásmidos estudiados hasta ahora controlan su número de copias mediante el uso de sistemas específicos de control negativo (Novick, 1987). Los principales sistemas inhibidores son de tres tipos: pequeños RNA contra-transcritos (ctRNAs), repeticiones directas de DNA (o iterones), y la acción combinada de una proteína represora y un ctRNA (del Solar *et al.*, 1998). El efecto inhibitor de los ctRNAs se debe a su apareamiento con la región complementaria de un RNA que se sintetiza tomando como molde la cadena de DNA opuesta y que es necesario para la iniciación de la replicación (ya sea como mRNA de *rep*, o como RNA cebador). La función de los iterones es más compleja, ya que constituyen un sitio de unión para las proteínas Rep, y son esenciales tanto para la iniciación como para la regulación de la replicación. El control negativo de los plásmidos con iterones se realiza a tres niveles: autorregulación de la proteína Rep, titulación de la proteína Rep, disminuyendo su disponibilidad, y desactivación del origen por el mecanismo de “handcuffing”. En el tercer sistema existen dos elementos que actúan en *trans*, una proteína represora que inhibe la transcripción de los genes de replicación, y un ctRNA que actúa sobre el mRNA de *rep* inhibiendo su traducción por la interacción directa con el sitio de unión a ribosomas, o bien favoreciendo su terminación prematura mediante la formación de terminadores de la transcripción.

Rango de huésped.

La capacidad de algunos plásmidos de atravesar la llamada “barrera genética” entre diferentes microorganismos ha suscitado una serie de preguntas sobre los mecanismos generales que controlan la replicación, y sobre la comunicación entre los componentes replicativos del plásmido y los que proporciona el huésped. Aunque los plásmidos son capaces de controlar de forma autónoma la frecuencia de iniciación de su replicación, dependen de la maquinaria replicativa de la célula hospedadora para el ensamblaje del replisoma y las siguientes etapas de elongación y terminación. Esto implica la existencia de una comunicación adecuada entre los factores específicos del

plásmido y los del huésped, incluyendo: (i) una transcripción y traducción equilibrada de los genes implicados en la replicación y su control; (ii) unos niveles de superenrollamiento adecuados, y (iii) la interacción apropiada con las proteínas del tipo histona (HU, IHF, y FIS) implicadas en la curvatura del DNA y la carga y ensamblaje del replisoma. La interacción plásmido-huésped ha atraído la atención de los investigadores por sus implicaciones evolutivas y medioambientales. Además, el rango de huésped tiene claras implicaciones en microbiología clínica y biotecnología.

La mayoría de los plásmidos de bacterias Gram-negativas (como ColE1, pSC101, P1, F, R6K, y R1) han resuelto el problema de la interacción plásmido/huésped con un número limitado de huéspedes muy relacionados entre sí. Otros plásmidos, como los que pertenecen a los grupos de incompatibilidad IncP-1 (RK2/RP4) e IncQ (RSF1010), han desarrollado diferentes estrategias que les permiten extenderse a la mayoría de los huéspedes Gram-negativos y a alguna bacteria Gram-positiva. Estos plásmidos que exhiben un rango de huésped amplio son denominados plásmidos promiscuos. En bacterias Gram-positivas, la mayoría de los plásmidos que replican por los mecanismos RC y theta presentan un rango de huésped entre medio y alto, y son capaces de establecerse en varias bacterias Gram-positivas y -negativas no relacionadas entre sí.

Los tipos de replicación conocidos basan sus diferencias en el mecanismo de iniciación de la replicación y en las distintas estructuras que adoptan los intermediarios de replicación. Existen tres mecanismos generales de replicación de plásmidos circulares: tipo theta, por desplazamiento de cadena, y círculo rodante.

- *Replicación por el mecanismo tipo theta.* Este mecanismo de replicación se ha estudiado en detalle entre los plásmidos circulares prototipo de bacterias Gram-negativas, aunque la replicación tipo theta también se ha descrito en plásmidos aislados de bacterias Gram-positivas del grupo estreptococal/estafilococal Inc18 (Bruand *et al.*, 1991), en algunos replicones de lactococos (Kiewiet *et al.*, 1993), y al menos en un plásmido de *Bacillus subtilis* (Meijer *et al.*, 1995). La replicación del DNA por este mecanismo implica la apertura de las dos hebras parentales, la síntesis de un RNA cebador (pRNA), y la iniciación de la síntesis de DNA por extensión del pRNA (Kornberg and Baker, 1992). La síntesis de DNA es continua en una de las cadenas (cadena líder) y discontinua en la otra (cadena retrasada), aunque durante la elongación la síntesis de ambas cadenas está acoplada (Figura 1). La replicación tipo theta puede empezar desde uno o varios orígenes, y puede ser uni- o bidireccional. Durante la elongación de la replicación se necesitan enzimas replicativas del huésped como DNA Polimerasa III holoenzima (Pol III HE), DnaB (helicasa de DNA) y SSB (proteína de unión a DNA de cadena sencilla), y la contribución de la girasa para solventar las constricciones topológicas introducidas por la horquilla replicativa en movimiento. La terminación de la replicación requiere la actividad de una topoisomerasa específica (Topo IV) para resolver los concatémeros formados por dos moléculas hijas de DNA circular generadas al final de la replicación. Los intermedios de replicación observados por microscopía electrónica presentan una forma característica que recuerda a la letra griega θ (theta), y cuando son digeridos por

enzimas que reconocen la región replicada, generan moléculas en forma de Y (horquilla).

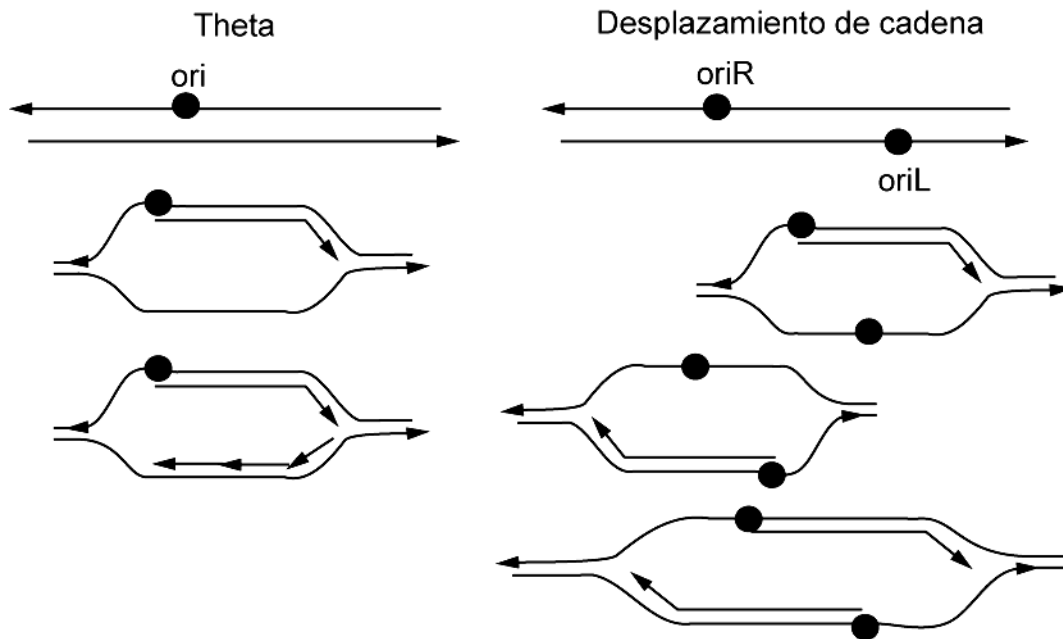


Figura 1. **Estructura de los intermedios de replicación tempranos correspondientes a los plásmidos que replican por el mecanismo tipo theta o por desplazamiento de cadena.** En el mecanismo **tipo theta**, y para simplificar, sólo se muestra un modo de replicación unidireccional desde un origen (círculo negro). La síntesis de DNA es continua en una de las cadenas (líder) y discontinua en la otra (retrasada). Sin embargo, la replicación de ambas cadenas está acoplada. En el mecanismo por **desplazamiento de cadena** la replicación puede iniciar independientemente desde cada uno de los orígenes (*oriR* y *oriL*; círculos negros), situados en cada una de las cadenas. La replicación procede desde estos orígenes de manera continua y en direcciones opuestas. La cadena que no se copia es desplazada durante la replicación. En la figura se muestran tres tipos de intermedios que corresponden a la iniciación independiente de la replicación desde cada uno de los orígenes y desde ambos. Esta figura fue extraída de (Espinosa *et al.*, 2000).

Con algunas excepciones, los plásmidos que usan el mecanismo theta de replicación necesitan una proteína iniciadora Rep. Además, algunos replicones dependen de DNA Polimerasa I (Pol I) del huésped para la primera etapa de la síntesis de la cadena líder.

-Replicones independientes de Pol I. La estructura global del origen de estos replicones es muy similar al origen de replicación *oriC* del cromosoma de *Escherichia coli*. El origen de replicación de estos plásmidos consiste generalmente en: (i) un grupo de secuencias de DNA repetidas o iterones, reconocidas específicamente por las proteínas Rep; (ii) uno o dos sitios de unión para la proteína iniciadora DnaA de *E. coli* (cajas *dnaA*); (iii) una secuencia rica en bases A + T adyacente a los iterones, y que normalmente contiene repeticiones similares a las repeticiones 13-mer del *oriC* de *E. coli*; y (iv) secuencias GATC que constituyen sitios de metilación por la metilasa Dam del huésped (Figura 2). En términos generales, la

iniciación de la replicación sigue el modelo propuesto para la replicación del cromosoma de *E. coli* a partir del *oriC*. El iniciador Rep reconoce y se une específicamente a los iterones del origen y, con la participación de la proteína DnaA, altera la conformación del DNA e inicia la apertura localizada de las dos hebras de DNA en la región adyacente rica en bases A + T. En la mayoría de los replicones, el monómero de Rep constituye la forma activa que se une a los iterones. Este primer evento es el único requerimiento específico, y una vez que sucede, los diferentes replicones aprovechan las enzimas replicativas del huésped hasta completar las siguientes fases de la replicación.

Los iterones del origen de replicación, junto con la proteína iniciadora Rep, están implicados en el control del número de copias plasmídico. Un primer control negativo se debe a la autorregulación ejercida por Rep, que es importante para evitar grandes fluctuaciones en la concentración de la proteína. Además, la autorregulación también es útil para corregir descensos en el número de copias plasmídico que lo sitúen por debajo de los niveles normales. En algunos replicones, como P1 y otros replicones relacionados, la región operadora/promotora está completamente enterrada dentro de los iterones del origen, de manera que la misma forma monomérica de Rep desempeña las funciones iniciadoras y autorreguladoras (Figura 2). En otros replicones (pSC101, R6K, pPS10; Figura 2), en los que el origen y la región operadora/promotora de *rep* están en dos loci diferentes, la replicación se inicia por la unión de la forma monomérica de Rep, mientras que la autorregulación se produce por la unión del dímero de Rep a unas repeticiones invertidas parecidas a los iterones. En resumen, los plásmidos regulados por iterones se han servido de la interacción específica Rep/iterón para diseñar una red de elementos reguladores que realizan un ajuste fino de la frecuencia de iniciación de la replicación en concordancia con la tasa de crecimiento bacteriano.

El plásmido conjugativo de bajo número de copias R1, prototipo del grupo IncFII de factores de resistencia a antibiótico, es un sistema modelo para estudiar la replicación y su control en ausencia de iterones. Este plásmido codifica una proteína iniciadora, RepA, que se une al origen de replicación *oriR*, que en lugar de iterones tiene dos palíndromos imperfectos. En R1, la frecuencia de iniciación de la replicación está regulada negativamente por un ctRNA de vida media muy corta.

-Replicones dependientes de Pol I. Los numerosos plásmidos dependientes de Pol I se han clasificado, en base a la homología de secuencia y a los requerimientos replicativos, en cinco familias cuyos prototipos son: ColE1, ColE2, pAM β 1, pCU1 y pJDB23. Aunque la arquitectura del replisoma y el mecanismo de elongación y terminación de la replicación en los plásmidos dependientes e independientes de Pol I son en apariencia comunes, se observan diferencias en el mecanismo de iniciación (Baker and Wickner, 1992; Marians, 1992). El ensamblaje del replisoma en los plásmidos independientes de Pol I incluye interacciones macromoleculares que causan la apertura del origen y la carga sucesiva de la helicasa, la primasa, y Pol III HE. Por contra, en los plásmidos dependientes de Pol I, el ensamblaje del replisoma ocurre después de la síntesis inicial de la cadena líder por

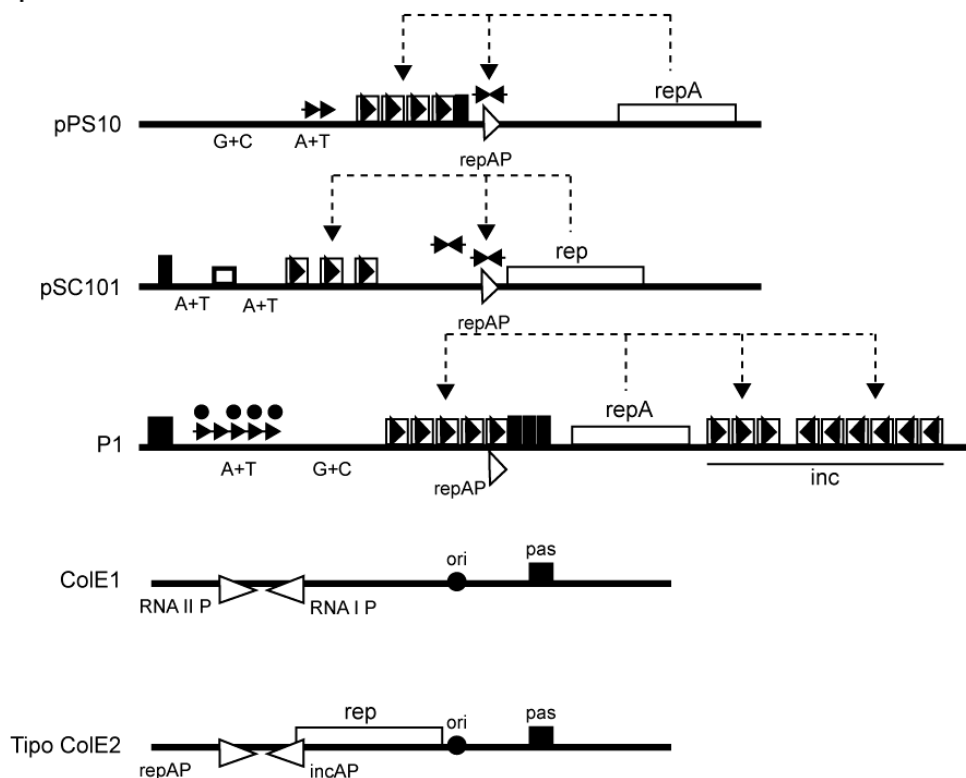
Pol I. Esta síntesis provoca la apertura del dúplex de DNA y activa el sitio de ensamblaje del primosoma dependiente de PriA, que atrae a la helicasa, a la primasa, y a Pol III HE. Este proceso constaría de tres fases: (i) síntesis del cebador para la polimerización dirigida por Pol I, (ii) entrada y progresión de Pol I y (iii) ensamblaje del replisoma. Mientras que los dos últimos pasos parecen estar conservados, las divergencias se centran en la formación del cebador. Uno de los mecanismos mejor estudiados es el del plásmido ColE1 (Figura 2), que se caracteriza porque su replicación depende sólo de proteínas de la célula hospedadora, en contraste con otros replicones dependientes de Pol I y con los plásmidos independientes de Pol I. Las proteínas RNA Polimerasa (RNAP) y RNasa H del huésped se encargan de la formación del RNA cebador (Baker and Wickner, 1992; Marians, 1992). La síntesis de un transcrito por RNAP propicia la formación de un híbrido RNA/DNA persistente que comienza unos 10-20 nt por delante del origen, y que es reconocido por RNasa H, la cual procesa el RNA y proporciona el extremo 3'-OH utilizado por Pol I para iniciar la síntesis del DNA. La proteína Rep de los plásmidos de la familia de ColE2 (Figura 2) es esencial para la replicación y presenta dos actividades distintas: se une específicamente al origen de replicación y presenta actividad primasa específica de sitio. Gracias a la actividad primasa, la proteína Rep es capaz de sintetizar un pequeño RNA complementario al extremo 3' del origen de replicación, que se ha observado asociado al extremo 5' de la cadena líder naciente generada *in vitro* (Takechi and Itoh, 1995; Takechi *et al.*, 1995). Por esta razón se postula que la síntesis del cebador, utilizado por Pol I para iniciar la replicación, sería realizada por la proteína Rep, lo cual es compatible con el hecho de que la síntesis de la cadena líder en ColE2 no se ve afectada por la presencia de rifampicina (inhibidor de RNAP) ni por la ausencia de una primasa funcional (Itoh and Horii, 1989). El mecanismo de formación del cebador en los plásmidos de la familia de pAM β 1 todavía no se conoce en su totalidad. Al igual que en los plásmidos de la familia de ColE2, la proteína Rep es esencial para la replicación y se piensa que está implicada en la maduración del RNA cebador. Además, la transcripción originada desde el promotor del gen *rep*, y que progresa en la dirección de replicación, tiene un efecto estimulante de la replicación. En células con una actividad primasa reducida, la síntesis de la cadena líder no está afectada, aunque sí la de la cadena retrasada. Estos datos sugieren que el RNA cebador utilizado por Pol I para iniciar la replicación es generado a partir de un transcrito (el propio mRNA *rep*) sintetizado por la RNAP y procesado por la proteína Rep (Bruand *et al.*, 1993).

En estos plásmidos, el control del número de copias lo desempeñan principalmente pequeños RNA antisentido. En los plásmidos de la familia de ColE1, el RNA antisentido (RNA I) evita la formación del cebador. El RNA I se une a las moléculas precursoras del cebador por apareamiento de bases complementarias, de manera que perturba su plegamiento y la formación del híbrido persistente RNA/DNA necesario para la generación del cebador (Helinski *et al.*, 1996). En los plásmidos de la familia de ColE2, el RNA antisentido regula negativamente la expresión del gen *rep* a nivel post-transcripcional por su interacción con la región 5' líder del mRNA de *rep* (Yasueda *et al.*, 1994). La replicación de los plásmidos de la familia de pAM β 1 está controlada por una proteína represora Cop en combinación con un RNA antisentido.

Ambos elementos actúan reprimiendo la transcripción desde el promotor del gen *rep*, disminuyendo la síntesis de proteína Rep y probablemente la formación del cebador, ya que la transcripción que activa la replicación al pasar por el origen se inicia en el promotor *rep* (Brantl, 1994; Brantl and Wagner, 1996; Le Chatelier *et al.*, 1996).

- *Replicación por desplazamiento de cadena*. Los ejemplos mejor conocidos de plásmidos que replican por este mecanismo pertenecen al grupo IncQ de plásmidos promiscuos, cuyo prototipo es RSF1010. Los miembros de este grupo requieren tres proteínas codificadas por el propio plásmido para iniciar su replicación: una proteína iniciadora, una helicasa y una primasa.

Tipo theta:



Tipo desplazamiento de cadena:

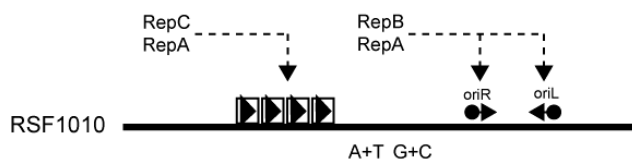


Figura 2. **Replicones básicos de algunos plásmidos que replican por el mecanismo tipo theta o por desplazamiento de cadena.** Los nombres de los plásmidos se muestran en la parte izquierda. La interpretación de los símbolos es la siguiente: las flechas incluidas dentro de recuadros indican iterones que se encontraron dentro de las regiones de replicación (*ori*) o de incompatibilidad (*inc*); A+T o G+C indican regiones ricas en estas bases; las flechas sobre regiones ricas en bases A+T indican repeticiones; las flechas negras sobre los mapas indican repeticiones invertidas que presentan homología parcial con los iterones; las flechas en línea discontinua indican las interacciones de las proteínas Rep o de los elementos de control del

número de copias con las regiones relevantes indicadas. Los promotores se indican como puntas de flecha blancas. Los rectángulos negros indican cajas *dnaA*, los rectángulos abiertos indican sitios de unión de IHF, y los círculos negros sitios de metilación *dam*. También se indican los sitios de ensamblaje de primasa o *pas*. Esta figura se confeccionó con la información obtenida en (del Solar *et al.*, 1998; Espinosa *et al.*, 2000).

Se piensa que el iniciador (RepC) guía la incorporación de la helicasa (RepA) codificada por el plásmido hasta el origen de replicación y que, posteriormente, se produce la síntesis del cebador por la primasa (RepB) (Scherzinger *et al.*, 1991). La amplitud de rango de huésped que presenta RSF1010 podría deberse a que su replicación es independiente de algunos factores del huésped. La apertura de la doble hélice del DNA tiene lugar a la manera clásica de los orígenes del tipo *oriC*, pero la replicación sucede desde dos orígenes monocatenarios simétricos y adyacentes (*oriR* y *oriL*) localizados en cada una de las cadenas del DNA (Figura 1). La síntesis de cada una de las hebras de DNA procede de manera continua gracias a un replisoma modificado, que incluye la helicasa específica del plásmido y que es capaz de desplazar la cadena que no es copiada (Scherzinger *et al.*, 1991). La síntesis de la cadena complementaria a la cadena desplazada se inicia a partir del origen monocatenario expuesto (Figura 1).

Replicación por el mecanismo RC. Por ser éste el mecanismo utilizado por el plásmido pMV158, cuya replicación es objeto de estudio en esta tesis, sus características más importantes se relatan en el siguiente Capítulo de la introducción.

2. REPLICACIÓN PLASMÍDICA POR EL MECANISMO RC

La replicación del DNA por círculo rodante es un mecanismo descubierto en los colifagos de cadena sencilla, y posteriormente observado y analizado en ciertos plásmidos bacterianos (del Solar *et al.*, 1993a). Algunos plásmidos mitocondriales de plantas, y los virus de las familias parvoviridae (virus animales) y geminiviridae (virus vegetales), también utilizan este modo de replicación (Backert *et al.*, 1997; Berns, 1990). Aunque los plásmidos que replican mediante este mecanismo (plásmidos RC) son abundantes en bacterias Gram-positivas, también los encontramos en bacterias Gram-negativas y en Arquea (Khan, 2000; Novick, 1998). Son moléculas de dsDNA de tamaño relativamente pequeño, generalmente menos de 10 kb. Aunque no existe una razón obvia para esta limitación de tamaño, es probable que esté impuesta por la eficiencia del modo de replicación RC. Muchos de los plásmidos RC descritos en la literatura son crípticos (del Solar *et al.*, 1998). Otros, sin embargo, llevan genes adicionales que codifican resistencias a antibióticos. También es frecuente encontrar genes implicados en movilización y transferencia plasmídica. Los plásmidos RC se presentan en multicopia y han adoptado varias estrategias para controlar estrictamente su número de copias. A diferencia de los colifagos de cadena sencilla, los plásmidos RC no realizan múltiples rondas replicativas a partir de un único evento de iniciación (Novick, 1998).

En los últimos años el número de plásmidos RC secuenciados ha aumentado hasta más de 200. Esto ha hecho posible analizar sus relaciones filogenéticas y mostrar que provendrían de unos pocos ancestros comunes. Los plásmidos RC se caracterizan por estar constituidos por módulos génicos intercambiables (Gruss, 1989; Khan, 2000; Novick, 1989). El único módulo esencial es el que contiene las funciones necesarias para la replicación y su control. Este módulo incluye el origen de replicación de cadena doble (*dso*), el gen *rep*, que codifica la proteína iniciadora (Rep), y los elementos implicados en el control de la replicación. Los plásmidos RC se han agrupado en varias familias (Osborn, 2002) en función de la homología a nivel de las proteínas Rep y los *dsos*. No obstante, los mecanismos moleculares subyacentes en la replicación RC sólo se han estudiado con detalle en los plásmidos de estafilococo pT181/pC221 (Khan, 2005; Thomas *et al.*, 1990) y pC194/pUB110 (Noirot-Gros *et al.*, 1994), y en el plásmido promiscuo pMV158 (del Solar *et al.*, 1998), que fue aislado originalmente de *Streptococcus agalactiae* (Burdett, 1980). Estos plásmidos se consideran los prototipos de tres de las diecisiete familias existentes.

El mecanismo de replicación por círculo rodante.

El mecanismo de replicación RC es unidireccional, y se considera un proceso asimétrico, ya que la síntesis de la cadena líder y la síntesis de la cadena retrasada no están acopladas (Figura 3). La replicación plasmídica RC es iniciada por la proteína Rep, que se une específicamente a una región del *dso* y a continuación corta específicamente una de las cadenas del DNA en otra región del *dso*, quedando unida covalentemente al extremo 5' fosfato generado por el corte a través de la tirosina presente en su centro activo. El extremo 3'OH es utilizado por las proteínas replicativas de la célula para iniciar la síntesis de la cadena líder. De esta manera, la cadena líder de nueva síntesis permanece unida a la parental, lo que supone una característica propia de este mecanismo de replicación. Rep es capaz de reclutar, a través de interacciones específicas proteína-proteína, a una helicasa de DNA (PcrA en bacterias Gram-positivas) que inicia el desenrollamiento del plásmido. Así, la síntesis de la nueva cadena, realizada por Pol III, está acompañada por el desplazamiento de la cadena parental. La hebra desplazada es recubierta por la proteína SsbA de unión a DNA de cadena sencilla (ssDNA). Cuando el replisoma alcanza el *dso* regenerado, se produce un bloqueo del movimiento de la horquilla de replicación. No se conoce la existencia de factores de terminación (tipo proteína Ter) y disponemos de poca información sobre cómo ocurre este proceso. En los plásmidos RC es posible que la proteína Rep, unida covalentemente a la cadena desplazada, sea responsable de la parada de la horquilla de replicación por su interacción con el *dso* regenerado. La replicación de la cadena líder concluye con un intercambio de cadenas mediado por una serie de reacciones de transesterificación. En este proceso interviene la tirosina activa de una segunda subunidad de proteína Rep o, en otros casos, otro residuo catalítico de la misma proteína. Los productos finales de la replicación de la cadena líder son una molécula de DNA plasmídico constituida por la cadena parental molde y la cadena líder de nueva síntesis, y un intermedio replicativo en forma de ssDNA

circular que corresponde a la cadena parental desplazada. La generación de este tipo de intermedios replicativos de cadena sencilla es la “marca de fábrica” de los plásmidos que replican por círculo rodante (Gruss, 1989; te Riele *et al.*, 1986). Finalmente, la conversión a dsDNA de estos intermedios se produce mediante la síntesis de la cadena retrasada a partir del origen de replicación de cadena sencilla (sso), por acción de las proteínas de la célula. Este proceso comienza con la síntesis por RNAP de un RNA cebador que es extendido por Pol I, y continúa con la síntesis del DNA por Pol III (Dempsey *et al.*, 1995; Díaz *et al.*, 1994; Kramer *et al.*, 1998). Por último, la ligasa sella los extremos de la molécula de dsDNA resultante. La girasa de DNA, proporcionada por el hospedador, es la encargada de superenrollar las moléculas de DNA plasmídico producidas durante la replicación.

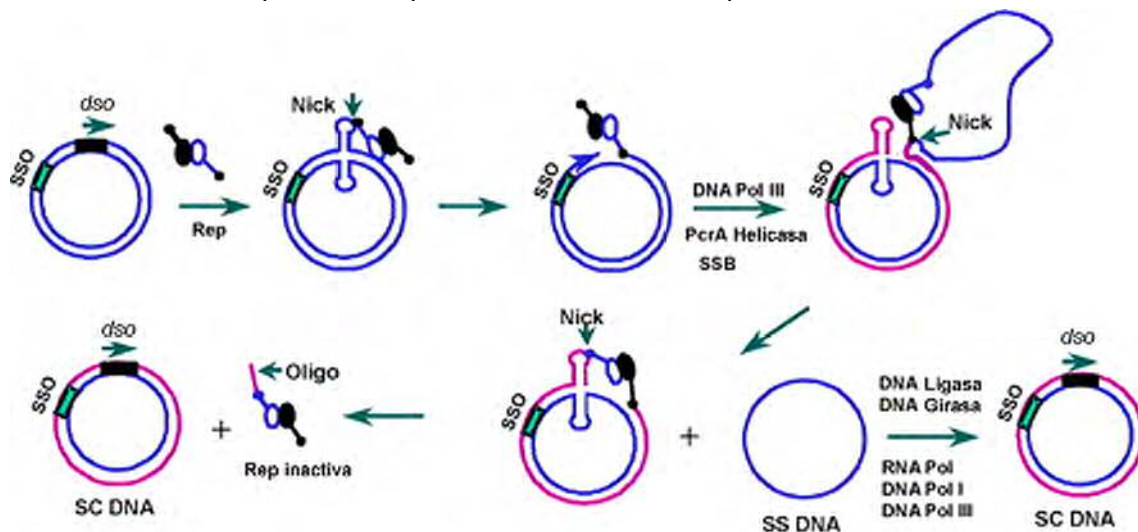


Figura 3. **Modelo de la replicación plasmídica RC.** Este modelo está basado en la replicación de los plásmidos de la familia de pT181. La proteína iniciadora de la replicación Rep reconoce el *dso* en DNA superenrollado e introduce un corte específico de secuencia generando un extremo 3'OH libre. Este extremo es elongado por las proteínas del huésped a la vez que la cadena parental es desplazada. Cuando la horquilla de replicación alcanza el *dso* reconstituido, la proteína Rep cataliza una reacción de transferencia de cadena, liberando un intermedio de ssDNA y una molécula de dsDNA con una cadena parental y otra de nueva síntesis (en rojo). En el caso de pT181, la síntesis de DNA continúa unos 10 nt más allá del sitio de corte. El iniciador RepC de pT181 actuaría como un dímero, de manera que un monómero efectuaría el primer corte, mientras que el segundo corte, durante la terminación lo realizaría el segundo monómero, generándose una proteína donde la tirosina activa de un monómero está unida a un oligo de 10 nt. Esta proteína, que ha catalizado una ronda de replicación de la cadena líder, es inactiva en replicación. La síntesis de la cadena retrasada en la molécula de ssDNA se inicia en el sso por la polimerasa de RNA del huésped. Esta enzima sintetiza un pequeño primer de RNA, y la síntesis de la cadena retrasada es realizada por polimerasas de DNA del huésped. El producto final son moléculas de DNA plasmídico superenrollado.

Control de la replicación.

Existen dos mecanismos descritos para el control de la replicación de los plásmidos RC. En los plásmidos de la familia de pT181, y probablemente también en los de la familia de pC194, el control es ejercido únicamente por ctRNAs que son complementarios a la región 5' que no se traduce del mRNA de *repC*. La formación del híbrido ctRNA/mRNA produce un cambio de conformación en una región del mRNA

apartada de la zona de apareamiento. La nueva configuración que adopta el mRNA de *repC* contiene una estructura secundaria en forma de horquilla seguida de una secuencia A(U)₆, que actuaría como un terminador de la transcripción independiente de Rho, truncando el mensajero de *repC* a la manera de los atenuadores transcripcionales que regulan algunos operones biosintéticos.

El control de la replicación en pMV158 se debe a la acción combinada de una proteína represora de la transcripción, CopG, y un pequeño ctRNA (denominado RNA II). El represor CopG se une a su propio promotor y reprime la transcripción del operón *copG-repB*. Las mutaciones o deleciones que afectan a CopG conducen a un aumento del número de copias plasmídico. RNA II es complementario a una región del mRNA *copG-repB* situada entre los genes *copG* y *repB*, y constituye un fuerte determinante de incompatibilidad. Las mutaciones que afectan a RNA II también producen un aumento del número de copias, aunque la replicación todavía está controlada por CopG. El modelo propuesto para la regulación de la replicación de pMV158 sugiere que el control es realizado por la acción global del circuito regulatorio más que por la intervención jerárquica de uno u otro de sus componentes.

El origen de replicación de doble cadena o dso.

La secuencia del *dso* suele ser menor de 100 pb de tamaño y se puede dividir funcionalmente en dos regiones: el locus *bind*, donde Rep se une específicamente, y el locus *nic*, que contiene la secuencia específica donde Rep desempeña su acción endonucleolítica. Es frecuente que el *dso* contenga secuencias con repeticiones invertidas que promuevan la formación de estructuras cruciformes en el DNA plasmídico superenrollado. La secuencia específica de corte se localiza normalmente en la región desapareada de una estructura tipo tallo-lazo [IR-II en pT181; IR-I en pMV158 (Figura 4)], lo cual explica el requerimiento absoluto de DNA superenrollado como sustrato replicativo (del Solar *et al.*, 1987; Moscoso *et al.*, 1995b; Noirot *et al.*, 1990). Los *dsos* de algunos plásmidos RC, como los de la familia de pMV158 o de pT181, son relativamente ricos en pares de bases G-C, en comparación con el resto de la secuencia del plásmido (Koepsel *et al.*, 1985; Moscoso *et al.*, 1995a; Wang *et al.*, 1993). Estas secuencias ricas en pares G-C podrían facilitar la generación y/o la estabilización de las estructuras cruciformes en el origen de replicación [(Noirot *et al.*, 1990), y este trabajo]. El locus *bind*, que suele consistir en unos 30 pb, constituye la región de especificidad donde el iniciador Rep se une con alta afinidad. Una característica típica de los plásmidos RC es que el locus *nic* está muy conservado entre los replicones de la misma familia, mientras que las diferencias se localizan en la región *bind*. Este hecho significa que las proteínas Rep de la misma familia deben tener un dominio catalítico común para el corte y posterior sellado del enlace fosfodiéster, a la vez que la especificidad de replicón estaría localizada en un motivo no conservado de la proteína. Aunque ambos loci, *nic* y *bind*, son esenciales para la iniciación de la replicación, sólo el locus *nic* es necesario en el proceso de terminación.

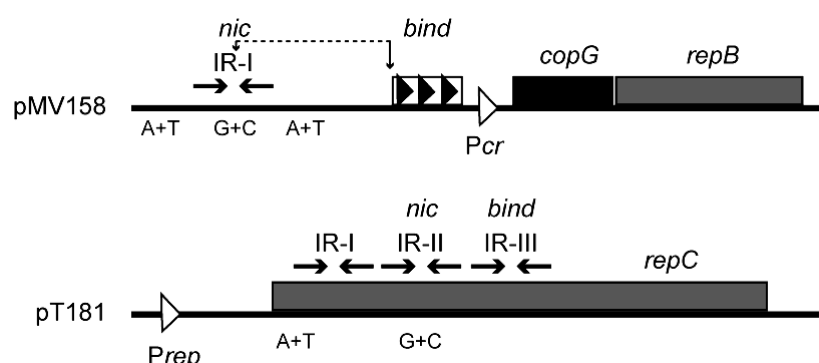


Figura 4. **Esquema del origen de replicación y la región adyacente de los plásmidos RC pMV158 y pT181.** Los nombres de los plásmidos se muestran en la parte izquierda. La interpretación de los símbolos es la siguiente: las flechas incluidas dentro de recuadros indican repeticiones directas dentro de la región de replicación; A+T o G+C indican regiones ricas en estas bases; las flechas negras sobre los mapas representan repeticiones invertidas. Los promotores se indican como puntas de flecha blancas. En el esquema del origen de pMV158, la línea de puntos indica la separación de 84 pb entre las repeticiones directas del locus *bind* y el sitio de corte.

Los plásmidos RC presentan una organización muy compacta (Figura 5). En los plásmidos de la familia de pT181, el *dso* se encuentra dentro de la secuencia codificante del gen *rep*. Esta organización, que podría asegurar la integridad del replicón durante procesos de transferencia, no es la que encontramos en la mayoría de plásmidos RC. En los plásmidos de las familias de pC194 y de pMV158, el *dso* y la región codificante del gen *rep* no solapan, pero están próximos entre sí. Otro de los aspectos característicos de la organización del *dso* afecta a la disposición relativa de los loci *nic* y *bind*. En general, ambas regiones están próximas, facilitando la colocación de Rep, a través de la interacción específica con *bind*, cerca del sitio de corte en el locus *nic*. En el *dso* de los plásmidos de la familia de pT181, los loci *nic* y *bind* son contiguos (Koepsel *et al.*, 1986) (Figura 4), y al cambiar la distancia que los separa se anula la actividad del origen de replicación (Jin and Novick, 2001). En estos plásmidos, y en los de la familia de pC194, el locus *bind* consiste en una repetición invertida (IR-III). Sin embargo, el locus *bind* de pMV158 consiste en un grupo de tres repeticiones directas que se encuentran a 84 pb del sitio de corte, localizado en el locus *nic*.

La organización del dso de pMV158 es única entre los plásmidos RC.

El plásmido pMV158, objeto de estudio en esta tesis, es el prototipo de una familia en la que la organización del *dso*, que es similar en todos los miembros, se caracteriza por el distanciamiento entre el locus *nic* y el locus *bind* (Figura 4). La secuencia específica de corte está muy conservada y, en dirección 3' desde la misma, se encuentran dos grupos de repeticiones directas que, por su distancia al sitio de corte, hemos denominado PDR (repeticiones directas proximales) y DDR (repeticiones directas distales). Aunque hasta el momento sólo se conocían las repeticiones DDR, las PDR están presentes en todos los plásmidos de la familia. Están formadas por dos o tres repeticiones de 7 pb (8 pb en los plásmidos pCI411 y pCL2.1), a una distancia

del sitio de corte que oscila entre 10 y 18 pb. En pMV158, y en los plásmidos de esta familia más relacionados con él, las DDR están formadas por tres repeticiones de 11 pb a una distancia del sitio de corte que oscila entre 80 y 86 pb, siendo de 84 pb en el *dso* de pMV158. Mediante ensayos de protección frente a DNasa I y radical hidroxilo (de la Campa *et al.*, 1990), se había observado que las DDR de pMV158 constituyen la región de unión específica de RepB al *dso*, por lo que pasaron a denominarse región *bind*. La región *nic* estaría formada por la repetición invertida IR-I, que contiene la secuencia específica de corte, y las PDR. RepB es capaz de relajar *in vitro* otros plásmidos de la misma familia, hecho que se explica por la conservación de la secuencia de corte. La unión específica a la secuencia de las DDR no es, por tanto, necesaria para la actividad de corte y sellado de las proteínas iniciadoras (Moscoso *et al.*, 1995b). Además, las DDR no constituyen un determinante de incompatibilidad hacia pMV158 (del Solar *et al.*, 1993b).

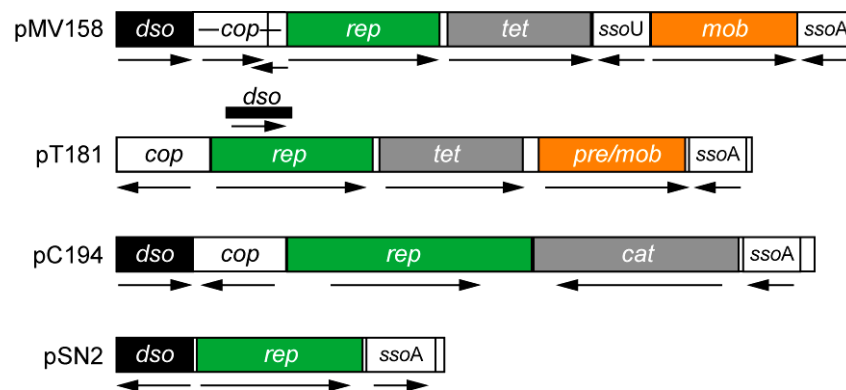


Figura 5. **Organización funcional de plásmidos RC.** Se muestran cuatro familias de plásmidos representados por pMV158, pT181, pC194 y pSN2. Las flechas indican la dirección de transcripción génica, o la dirección de replicación de la cadena líder (desde el *dso*) y de la cadena retrasada (desde el *sso*). Dentro de los recuadros, *rep* es el gen de replicación; *cop* es el gen de control del número de copias; *dso* es el origen de replicación de cadena doble; *sso* es el origen de replicación de cadena sencilla; *cat* y *tet* son genes de resistencia a cloramfenicol y tetraciclina, respectivamente; *pre/mob* es el gen de movilización conjugativa.

Dentro de los plásmidos RC, la localización del locus *bind* alejado del sitio específico de corte es una característica única del *dso* de pMV158 y de los plásmidos de esta familia. Esta particularidad implica un nuevo mecanismo por el cual la proteína RepB, iniciadora de la replicación de pMV158, es capaz de actuar en dos regiones distantes dentro del *dso*. Las repeticiones directas PDR, presentes en el locus *nic* de todos los plásmidos de la familia, podrían desempeñar una función en el proceso de inicio de la replicación.

3. LAS PROTEÍNAS INICIADORAS DE LA REPLICACIÓN DE PLÁSMIDOS RC.

Las proteínas Rep de los plásmidos RC pertenecen a la superfamilia RCR de dominios de proteínas que son capaces de cortar y sellar el DNA durante la transferencia o movilización conjugativa plasmídica (proteínas de la clase Mob), o durante la replicación RC de plásmidos, bacteriófagos de cadena sencilla, o virus animales o vegetales (proteínas de la clase Rep) (Ilyina and Koonin, 1992; Koonin and Ilyina, 1993; Pansegrau and Lanka, 1991; Waters and Guiney, 1993). Las dos clases de proteínas se caracterizan por la presencia de un motivo HUH con la secuencia conservada HUHuuu (donde u es un residuo hidrofóbico), que constituye un posible dominio de unión a metales. Por analogía con otras metaloenzimas, se postuló en un principio que los dos residuos His conservados podrían estar implicados en la coordinación del ion metálico (Ilyina and Koonin, 1992; Koonin and Ilyina, 1993), una función que ha sido confirmada posteriormente gracias a la resolución de la estructura de algunas de las proteínas de esta superfamilia (véase más adelante). En las proteínas de la clase Rep, el motivo HUH o motivo 2 está acompañado por otros dos motivos conservados que se disponen en el siguiente orden: N-1-2-3-C, donde el motivo 3, con la secuencia uxxYuxh, contiene el residuo Tyr que podría formar parte del centro catalítico de la proteína. Las proteínas de la clase Mob se caracterizan porque la posición de la Tyr catalítica relativa al motivo HUH (motivos conservados en el orden N-3-2-C) es opuesta a la que se observa en las proteínas de la clase Rep.

Las proteínas de la clase Rep.

La replicación plasmídica RC comienza con el corte de DNA específico de secuencia, efectuado por Rep en el *dso* mediante el ataque nucleofílico de la tirosina del centro activo. Los aminoácidos del dominio catalítico, incluyendo la supuesta Tyr activa, tienen un alto grado de conservación entre las proteínas Rep de los plásmidos que pertenecen a la misma familia (Figura 6) (del Solar *et al.*, 1998). Generalmente, las proteínas iniciadoras pueden relajar el DNA de los plásmidos de la misma familia debido a la conservación de la secuencia de corte en los *dsos*. Sin embargo, la iniciación de la replicación de los plásmidos RC está determinada por la unión específica de Rep al *dso*. Por esta razón, el corte del origen de replicación por una Rep heteróloga no sería suficiente para promover la replicación, ya que la formación *in vivo* de un complejo de iniciación activo requiere la interacción específica entre RepB y el locus *bind*.

Los iniciadores de la familia de pT181/pC221 son dímeros en solución, y consisten en cadenas polipeptídicas de unos 300 aminoácidos con una estructura modular de supuestos dominios implicados en la unión no covalente al DNA o en el corte y cierre del DNA del origen (Rasooly *et al.*, 1994; Thomas *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 1998). Curiosamente, tanto las proteínas Rep de los plásmidos de esta familia como las de los fagos filamentosos de DNA de cadena sencilla, carecen del motivo 2 (HUH). El supuesto dominio nucleolítico de las proteínas Rep de esta familia está

localizado en la mitad de la proteína (Khan, 2005). Los residuos Tyr en las posiciones 191 y 188 de las proteínas Rep de pT181 y pC221, respectivamente, son responsables de la rotura del enlace fosfodiéster del dinucleótido 5'-ApT-3' de la secuencia de corte del *dso*. Además, estos residuos Tyr permanecen unidos de forma covalente al extremo 5'-fosfato generado en la reacción de corte (Thomas *et al.*, 1990). La sustitución del residuo Tyr activo por Ser o Phe, tanto en RepD de pC221 como en RepC de pT181, produce variantes de la proteína que conservan la capacidad de unirse específicamente al DNA pero que han perdido la capacidad de unirse de manera covalente al *dso* y de mediar la reacción de corte y cierre en DNA superenrollado (Dempsey *et al.*, 1992a; Thomas *et al.*, 1990). Las mutaciones que afectan a la parte C-terminal de RepC, dentro de una región divergente entre las proteínas Rep de la familia de pT181, mostraron que los aminoácidos de las posiciones 267-270 están implicados en el reconocimiento específico del DNA (Dempsey *et al.*, 1992a). Por tanto, el dominio de unión específica a DNA de RepC estaría localizado en la región C-terminal.

Las variantes de RepC que han perdido su actividad nucleolítica, o su capacidad de unión específica al DNA, son, además, inactivas en replicación, lo que demuestra que ambas actividades son esenciales en la iniciación de la replicación de pT181 mediada por RepC (Dempsey *et al.*, 1992a). La información sobre la estructura y organización de los dominios de los iniciadores de otras familias de plásmidos RC es limitada. El centro activo de la proteína RepA de pC194 está constituido por al menos tres residuos, Tyr214, Glu142 y Glu210 (Noirot-Gros *et al.*, 1994). El residuo Tyr214 está implicado en la iniciación de la replicación mediante el ataque nucleofílico al enlace fosfodiéster del sitio de corte en el *dso*, aunque la mutación de este residuo no afecta a la afinidad de unión del iniciador al DNA. En el modelo propuesto para la replicación de pC194, el residuo Glu142 podría facilitar el ataque mediante la unión y posicionamiento del ión metálico, mientras que el residuo Glu210 intervendría en la terminación, probablemente activando una molécula de agua que mediaría el segundo ataque nucleofílico sobre el enlace fosfodiéster que une la cadena parental con la de nueva síntesis (Noirot-Gros *et al.*, 1994). Las proteínas Rep de otros plásmidos de la familia de pC194, como pKYM o pGT5, también presentan un residuo Tyr implicado en el corte del DNA del origen de replicación (Marsin and Forterre, 1999; Yasukawa *et al.*, 1991).

El alineamiento de la secuencia de las proteínas Rep de la familia de pMV158 permitió identificar una serie de motivos de secuencia primaria conservada designados R-I, R-II, R-III, R-IV y R-V [(del Solar *et al.*, 1993a) y (Figura 6)]. Los motivos R-I, R-III y R-IV corresponderían a los motivos 1, 2 y 3, descritos por Ilyina y Koonin (Ilyina and Koonin, 1992), conservados entre las proteínas de la clase Rep. Sin embargo, los motivos R-II y R-V podrían ser específicos de las proteínas Rep de esta familia. Debido a la elevada homología que exhiben las proteínas Rep de la familia de pMV158 a nivel de la región N-terminal, y a que en ésta se encuentran los motivos conservados de la superfamilia de dominios RCR, se postuló que dicha región estaría implicada en las actividades de corte y sellado del DNA de la secuencia de corte conservada,

mientras que la parte C-terminal, más divergente, participaría en el reconocimiento específico del *dso* (del Solar *et al.*, 1993a).

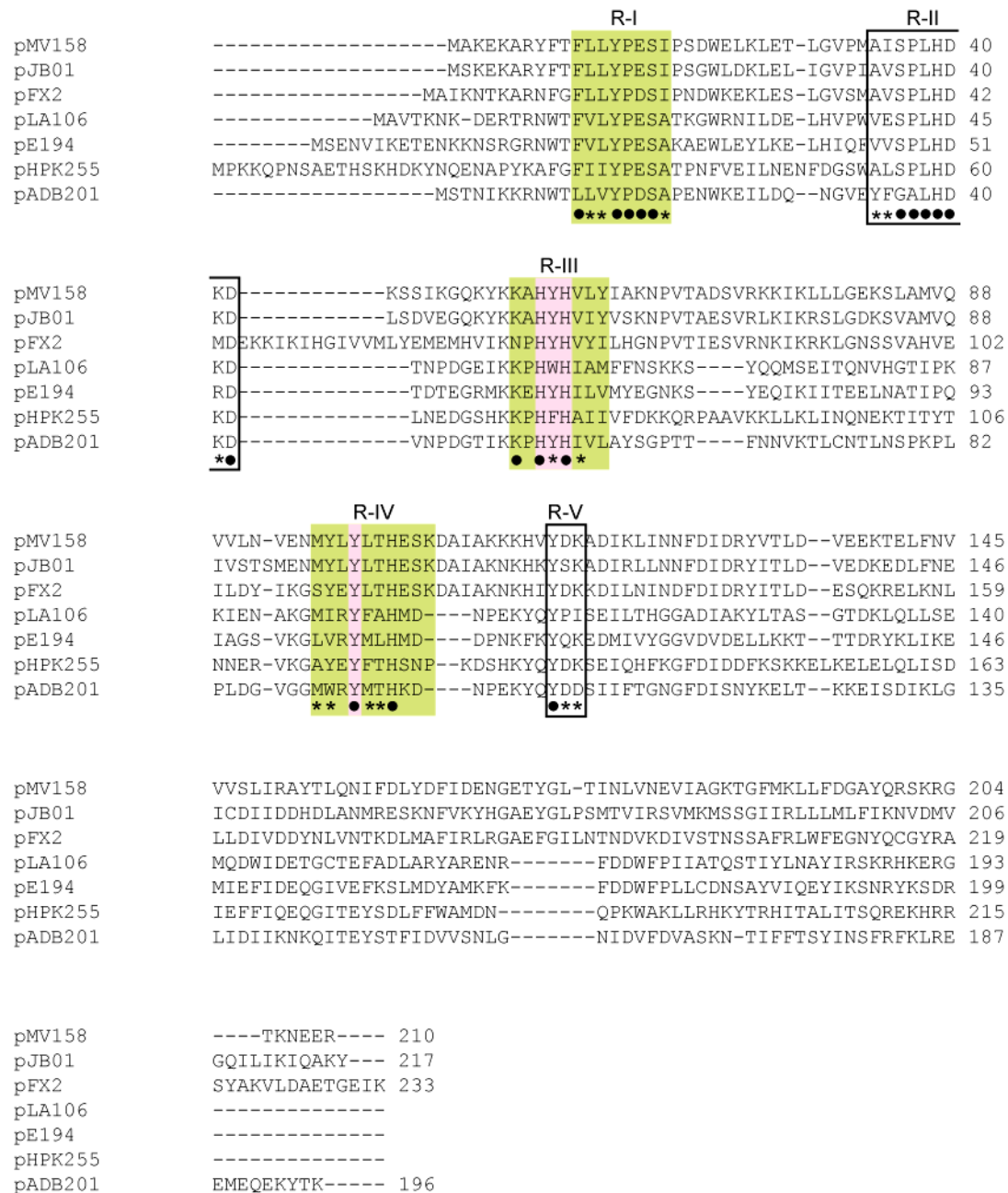


Figura 6. **Alineamiento de la secuencia de algunas proteínas iniciadoras Rep de la familia de pMV158.** Las secuencias fueron alineadas con el programa ClustalW, mediante el método de alineamiento entre pares, con una penalización de 10 por la apertura de un hueco en el alineamiento y de 0,2 por cada residuo que se extiende dicho hueco. Los motivos de secuencia conservada R-I, R-II, R-III, R-IV y R-V se indican en el alineamiento. Los motivos R-I, R-III y R-IV, que corresponden aproximadamente a los motivos 1, 2 y 3 definidos por Ilyina y Koonin (1992), están sombreados en verde, con los residuos del motivo HUH y el residuo Y catalítico sombreados en color rosa. El grado de identidad de secuencia de los residuos de los motivos conservados se indica en la parte inferior del alineamiento: ●, indica residuos idénticos en seis o siete del total de secuencias; *, indica residuos idénticos en cuatro o cinco del total de secuencias.

Los motivos R-IV y R-V contienen los residuos Tyr conservados en todas las proteínas Rep de la familia. En RepB de pMV158, que es un hexámero en solución (de la Campa *et al.*, 1990; Ruiz-Masó *et al.*, 2004), estos residuos ocupan las posiciones 99 y 115, respectivamente, y ambos podrían participar en la reacción de corte y cierre del DNA del origen de replicación (Moscoso *et al.*, 1997). Se pensó que el residuo Tyr99 era el que formaba parte del centro activo de RepB, ya que la secuencia de los aminoácidos adyacentes coincidía con la de la Tyr del motivo conservado 3 (uxxYuxh) (Moscoso *et al.*, 1997). Además, al cambiar la Tyr99 por Phe o Ser se generaban variantes de la proteína que, aunque conservaban la capacidad de unión específica a la región *bind* del *dso*, habían perdido su actividad *in vitro* de corte y cierre del DNA. No obstante, el mutante Y99F presentaba actividad de corte residual sobre oligos monocatenarios (Moscoso *et al.*, 1997). Debido a la actividad residual de este mutante, no se pudo descartar que la Tyr115, o incluso la Tyr97, tuvieran cierta actividad catalítica (Moscoso *et al.*, 1997). Asimismo se ha postulado que el Glu16, del motivo conservado R-I, o la His39, localizada en el motivo R-II, podrían participar en la facilitación y/o activación del ataque nucleofílico mediado por la Tyr activa (Moscoso *et al.*, 1997). Las proteínas RepB de pMV158 y de pJB01 presentan aproximadamente un 80% de identidad de secuencia de aminoácidos en la mitad N-terminal (aproximadamente hasta el residuo 123). En RepB de pJB01, el residuo Tyr100 (equivalente al residuo Tyr99 de RepB de pMV158) sería el responsable de la actividad de corte y cierre del DNA (Kim *et al.*, 2006). En las Rep de estos plásmidos, el motivo R-I parece desempeñar un papel importante en la funcionalidad de las proteínas. El cambio del Glu16 por una Lys en la RepB de pJB01, produce una pérdida de la actividad de corte y cierre (Kim *et al.*, 2006). Por otra parte, la delección del DNA que codifica el motivo R-I de RepB de pMV158, produce plásmidos que no se pueden establecer en *S. pneumoniae* a menos que la proteína RepB intacta sea suministrada *in trans* (del Solar *et al.*, 1993b). Otras mutaciones en residuos de los motivos R-III, R-IV y R-V de RepB de pJB01, como los cambios Y56F, Y56D, E104Y y Y116W, así como la delección de los residuos 55 a 57 (que constituyen el motivo HUH de unión a metales divalentes), produjo una pérdida de la actividad enzimática sobre ssDNA (Kim *et al.*, 2006). Por otro lado, el análisis de la actividad de varios mutantes de la proteína iniciadora RepB del plásmido pJB01, reveló que ambas regiones, N- y C-terminal, son necesarias para la unión al DNA del origen (Kim *et al.*, 2006).

La reacción de transferencia de cadena mediada por Rep.

Las reacciones de transferencia de cadena de DNA, mediadas por un residuo nucleofílico de Tyr, son reacciones isoenergéticas. La energía procedente de la rotura del enlace fosfodiéster se conserva en forma de enlace covalente entre la Tyr activa y el extremo 5'-fosfato del DNA generado en el corte durante el inicio de la replicación. Esto permite la recircularización de la cadena parental desplazada y la transferencia de cadena en el sitio de corte durante la etapa de terminación. Sin embargo, esto podría no ser una característica general, ya que RepB no parece formar un enlace

tirosil-fosfodiéster estable con su DNA diana (Moscoso *et al.*, 1997). Para estudiar la reacción de transferencia de cadena mediada por RepB se analizó la quiralidad del fosfato implicado en la reacción de corte. Para ello se usaron una serie de oligos en los que se introdujo un centro quiral en el residuo fosfato del sitio de corte. Los resultados mostraron que la reacción de transferencia de cadena mediada por RepB tiene lugar en dos pasos (o en un número par), lo que sugiere la formación de un intermedio RepB-DNA covalente y transitorio durante esta reacción (Moscoso *et al.*, 1997). Algo parecido se ha observado con la proteína iniciadora gpII del fago filamentoso M13, que también replica por el mecanismo RC. Aunque en principio no se pudo demostrar la existencia de complejos covalentes gpII-DNA, los experimentos realizados con oligos sintéticos y tiempos de reacción muy cortos, mostraron la formación de un enlace covalente transitorio entre el residuo Tyr197 de la región N-terminal y el extremo 5' del DNA cortado (Asano *et al.*, 1999). Al igual que ocurre en el resto de proteínas Rep analizadas, la sustitución de la Tyr197 de gpII por otro residuo, en este caso por Phe, no altera la actividad de unión específica a DNA de la proteína ni su capacidad de curvar el DNA del origen de replicación (Asano *et al.*, 1999).

Los iniciadores de la replicación RC generalmente contienen dos residuos catalíticos, ya que el corte en el *dso* debe ocurrir también durante la terminación. En el modelo propuesto para la replicación de los plásmidos de la familia de pT181, las proteínas Rep actuarían como dímeros, y utilizarían el residuo Tyr191 de uno u otro monómero en cada una de las reacciones de la iniciación y la terminación (Rasooly *et al.*, 1994). La proteína RepA de pC194 actuaría como un monómero y en el corte del DNA durante la terminación participaría el residuo Glu210, muy próximo al residuo Tyr214 que participa en la iniciación (Noirot-Gros *et al.*, 1994). La sustitución del residuo Glu210 por una Tyr cambia la reacción de hidrólisis, propia de la terminación, por una transesterificación. Con esta aproximación, se consigue que plásmidos basados en pC194 puedan reiniciar la replicación después de la última ronda, comportándose de un modo similar al fago filamentoso Φ X174 (Noirot-Gros and Ehrlich, 1996). Respecto a pMV158, no se conoce que residuo de RepB produce el segundo corte durante la terminación de la replicación. Cualquiera de los mecanismos propuestos para las proteínas Rep diméricas o monoméricas de otros plásmidos RC podría ser válido para RepB, cuyo estado de oligomerización funcional se desconoce. Los residuos Tyr97 o Tyr115, presentes en los motivos conservados R-IV y R-V, respectivamente, podrían intervenir en el proceso de terminación con un mecanismo similar al empleado por la proteína Rep del fago Φ X174 (Hanai and Wang, 1993; van Mansfeld *et al.*, 1986), que también contiene dos Tyr en su centro activo. Alternativamente, el mismo residuo Y99 de otro monómero, o bien un residuo ácido del entrono del centro activo, podrían mediar en la terminación de la replicación de pMV158.

Una diferencia fundamental entre la actividad bioquímica de los iniciadores de la replicación RC codificados por plásmidos y por colifagos de cadena sencilla consiste en que, mientras los iniciadores de los fagos son capaces de reiniciar la replicación de la misma molécula de DNA, generando una progenie de varias moléculas, los iniciadores plasmídicos son incapaces de hacerlo. Este hecho implica la existencia de

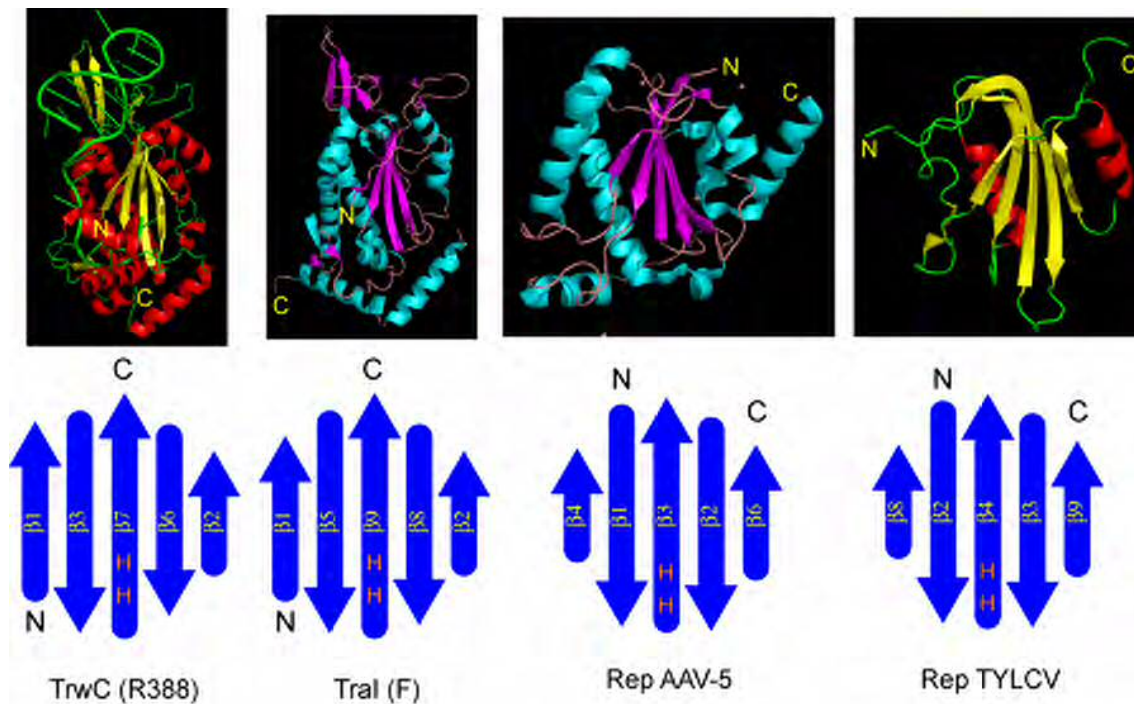
mecanismos que impedirían que las proteínas Rep de plásmidos RC quedaran covalentemente unidas a la cadena de DNA recién sintetizada, tras el corte de la secuencia *nic* del *dso* durante la etapa de terminación. Los mecanismos que controlan la replicación de plásmidos RC, inexistentes en los fagos de cadena sencilla, se basan en una regulación estricta de los niveles de proteína iniciadora, la cual debe complementarse con mecanismos de inactivación de la proteína que eviten la reutilización de las proteínas Rep después de cada ronda replicativa, de modo que se asegure un número fijo de iniciaciones. Otra condición que debería cumplir este mecanismo es que la proteína Rep inactiva no interfiera en la actividad de otra molécula de Rep no usada. Este aspecto sólo se ha estudiado en las proteínas Rep de la familia de pT181, que actuarían como dímeros durante la replicación. El residuo Tyr191 de una subunidad de RepC permanece covalentemente unido al extremo 5' del DNA parental durante la síntesis de la cadena líder, hasta que la horquilla replicativa prosigue la síntesis unos 10 nt más allá del sitio de corte regenerado. En este momento, el residuo Tyr191 libre de la segunda subunidad corta la cadena de ssDNA desplazada y, después de una serie de reacciones concertadas de corte y cierre, se produce la liberación de la cadena parental en forma de ssDNA circular y de una molécula de dsDNA. Al mismo tiempo, se genera un aducto covalente entre una de las subunidades de RepC y el oligo de unos 10 nt en que se sobrepasó la síntesis de la cadena líder (Rasooly and Novick, 1993). Este heterodímero proteico, denominado RepC/RepC* para pT181 y RepD/RepD* para pC221, no muestra actividad de corte sobre DNA superenrollado. Además, y a pesar de conservar actividad de unión al DNA del origen, no es capaz de inducir la apertura del origen y, por tanto, de iniciar la replicación (Jin *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 1998). No obstante, todavía no se conocen las bases moleculares de la pérdida de actividad biológica de los iniciadores inactivos de los plásmidos de la familia de pT181.

Estructura del dominio nucleasa de proteínas de las clases Rep y Mob.

A pesar de la acumulación, durante décadas, de datos genéticos y bioquímicos sobre proteínas de las clases Rep y Mob, la información sobre su estructura tridimensional ha tardado en llegar. En el año 2002, y de manera casi simultánea, se publicó la determinación de la estructura del dominio endonucleasa de la proteína Rep (Rep 1-197) del virus asociado a adenovirus (AAV-5, un parvovirus de mamíferos usado en terapia génica) (Hickman *et al.*, 2002), y del dominio análogo de la proteína Rep (Rep 4-121) del geminivirus TYLCV (virus del rizado amarillo del tomate) (Campos-Olivas *et al.*, 2002). El genoma del geminivirus es circular y de cadena sencilla, y replica por RC a través de un intermedio bicatenario. El genoma del virus AAV-5 es una molécula de ssDNA lineal que replica por el mecanismo denominado “rolling hairpin”, caracterizado por la presencia de repeticiones invertidas en los extremos, que se pliegan para formar estructuras secundarias donde se localizan las secuencias del origen de replicación. Con posterioridad, y también de manera casi simultánea, se resolvió la estructura del dominio relaxasa de las proteínas de transferencia plasmídica Tral (Tral36) del plásmido F, y TrwC (TrwC-N293) del

plásmido R388 (Datta *et al.*, 2003; Guasch *et al.*, 2003). Estas “transferasas” de cadena de DNA catalizan las etapas iniciales y finales del procesamiento del DNA durante su transferencia conjugativa de una célula a otra.

En las cuatro proteínas cuya estructura tridimensional se ha resuelto parcialmente, el dominio con actividad endonucleolítica está situado en el extremo N-terminal. Además, todas ellas se caracterizan por la presencia de actividades ATPasa y helicasa en la región C-terminal. Inicialmente, y debido a la escasa homología a nivel de secuencia y a la diferente organización de los elementos de estructura secundaria comunes, no fue posible la identificación de similitudes estructurales entre las cuatro proteínas. Sin embargo, al comparar la estructura tridimensional, se observa que todas ellas comparten un dominio en forma de sándwich α/β , que consiste en una lámina β , formada por cinco cadenas antiparalelas, y dos hélices flanqueando una de las caras de la lámina, aunque en Rep de TYLCV sólo está presente una de las hélices (Figura 7). Además, el residuo Tyr catalítico de las proteínas Rep virales está localizado en una hélice α que tiene una posición tridimensionalmente equivalente a la hélice α_1 de Tral y TrwC.

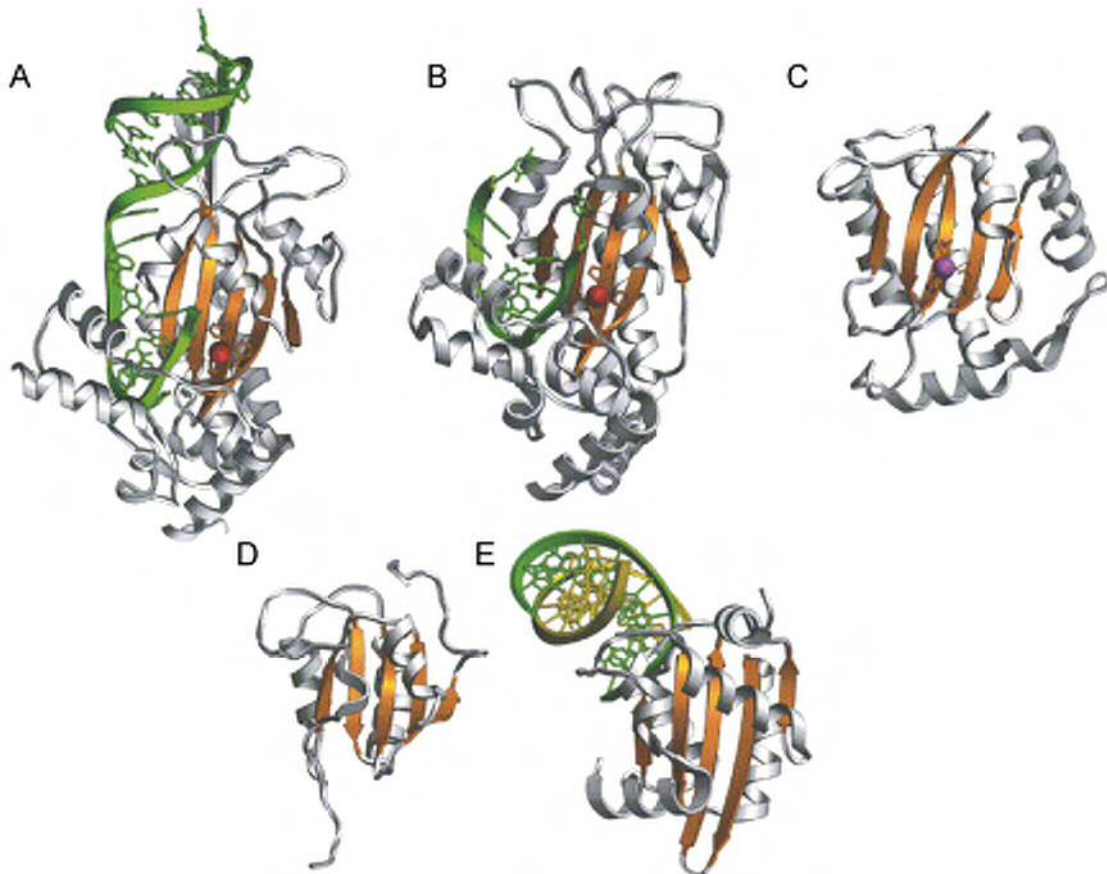


Tral (F)	$\beta_1 \alpha_1 \beta_2 \alpha_2 \alpha_3 \beta_3 \beta_4 \beta_5 \alpha_4 \alpha_5 \beta_6 \beta_7 \beta_8 \beta_9$
TrwC (R388)	$\beta_1 \alpha_1 \alpha_2 \beta_2 \alpha_3 \alpha_4 \beta_3 \alpha_5 \alpha_6 \beta_4 \beta_5 \beta_6 \beta_7$
Rep AAV-5	$\beta_1 \alpha_1 \alpha_2 \beta_2 \beta_3 \alpha_3 \beta_4 \beta_5 \alpha_4 \beta_6$
Rep TYLCV	$\beta_1 \beta_2 \alpha_1 \beta_3 \beta_4 \beta_5 \beta_6 \beta_7 \beta_8 \alpha_2 \beta_9$

Figura 7. Comparación del plegamiento de los dominios RCR de las proteínas de las clases Rep y Mob. En la parte superior se muestran, de izquierda a derecha, las estructuras correspondientes a: TrwC de R388 en complejo con un ssDNA 25mer (Guasch *et al.*, 2003) (código PDB 1qx0), Tral de F (Datta *et al.*, 2003) (código PDB 1p4d), Rep de AAV-5 (Hickman *et al.*, 2002) (código PDB 1m55), y Rep de TYLCV (Campos-Olivas *et al.*, 2002) (código PDB 1l2m). Debajo de cada estructura se muestra la topología de la lámina β central (formada por cinco cadenas antiparalelas), incluyendo la orientación relativa a sus extremos amino y carboxilo. Se puede apreciar que tanto Tral como TrwC están permutadas circularmente respecto a las otras dos proteínas. En la parte inferior de la figura se muestra la secuencia de elementos de estructura secundaria de cada una de las estructuras. Se indican en rojo las cinco cadenas β que constituyen la lámina central, así como la hélice α que contiene el residuo Y catalítico del centro activo.

La topología de las cadenas que forman la lámina β es diferente entre las proteínas Rep virales y las proteínas Tra plasmídicas, lo que confirma que el dominio nucleasa de las proteínas de la clase Mob está permutado circularmente respecto al mismo dominio en la clase Rep, como inicialmente sugirieron Ilyina y Koonin en base a la localización del residuo Tyr catalítico relativa al motivo HUH (Figura 7). Puesto que la permutación circular cambia el orden de las cadenas β , el plegamiento del dominio nucleasa de las proteínas de las clases Rep y Mob es diferente. No obstante, las tres cadenas de la parte central de la lámina β quedan conectadas de la misma manera (Figura 7), y constituirían el núcleo del plegamiento de este dominio. De hecho, dos de las tres cadenas β del núcleo central con topología conservada entre las clases Rep y Mob contienen los tres residuos que unen el metal. En ambas clases de proteínas, el residuo Tyr nucleofílico tendría una localización diferente desde el punto de vista topológico, pero similar con respecto a la estructura tridimensional.

El plegamiento global del dominio “relaxasa” de TrwC/Tral y del dominio endonucleasa de las proteínas Rep de los virus AAV-5 y TYLCV presenta un parecido estructural con el dominio de unión al DNA del origen (OBD) de las proteínas virales de replicación theta E1 de papilomavirus (Enemark *et al.*, 2000) y antígeno T grande del virus 40 de simio (SV40) (Luo *et al.*, 1996). La similitud estructural, al igual que ocurre entre las proteínas Tra y Rep, no se refleja a nivel de la secuencia de aminoácidos, ya que no existe una identidad de secuencia significativa entre ellas ni con la superfamilia de dominios RCR. Todas estas proteínas comparten el sándwich α/β característico, con una lámina β central antiparalela de cinco cadenas y las dos hélices flanqueantes, aunque los dominios OBD de las proteínas virales E1 y antígeno T grande no tienen ni el motivo HUH ni la Tyr catalítica (característicos de las proteínas de la superfamilia RCR), y no poseen actividad nucleolítica (Figura 8). En la estructura del dominio nucleasa de proteínas de la superfamilia RCR se puede identificar fácilmente una hendidura que contiene el centro activo. En los OBD de las proteínas E1 y antígeno T grande, algunas extensiones procedentes del extremo amino rellenan el espacio de la cavidad que ocuparía el centro catalítico. Tanto E1 como el antígeno T grande se unen específicamente a sus correspondientes orígenes de replicación, donde inician el ensamblaje de complejos proteicos de mayor orden para facilitar la distorsión y apertura del DNA, y reclutan otras proteínas del replisoma.



Gomis-Rüth F. X. & Coll M. (2006). *Current Opinion in Structural Biology*.

Figura 8. Comparación del plegamiento del dominio endonucleasa de las proteínas de las clases Rep y Mob con el dominio OBD de algunas proteínas virales de replicación. (A) Estructura de TrwC de R388 en complejo con una ssDNA 27-mer (en verde) (código PDB 2cdm). La lámina β central compartida con las proteínas con dominio OBD se muestra en color naranja. Una molécula de agua ocupa el lugar del metal (esfera roja) y está coordinada por tres residuos His (varillas naranjas) de dos cadenas antiparalelas. (B) Estructura de Tral de F en complejo con un ssDNA 10-mer (código PDB 2a0i), con el código de color como en (A). La esfera roja indica un ión metálico asignado como Mg^{2+} . (C) Dominio endonucleolítico de la proteína Rep de AAV-5 (código PDB 1m55). La esfera en color púrpura indica un ión metálico Zn^{2+} coordinado por los residuos His de la secuencia consenso HUH y un residuo Glu adicional (varillas naranjas). (D) Dominio OBD del antígeno T de SV40 (código PDB 2tbd), con el código de color como en (A). (E) Estructura del iniciador de la replicación E1 de papilomavirus bovino en complejo con un fragmento de dsDNA de 21 pb (código PDB 1ksy). Para simplificar, sólo se muestra la mitad del complejo proteína dimérica-operador, con el código de color como en (A), y la segunda cadena de DNA en amarillo.

Características e implicaciones de la unión del metal divalente en el centro activo.

La arquitectura del centro activo de las proteínas de las clases Rep y Mob se caracteriza por la presencia de tres residuos en posiciones equivalentes coordinando la unión del ión metálico: las dos His del motivo HUH y un tercer residuo, que es otra His en Tral y TrwC y que corresponde a un Glu en las proteínas Rep de AAV-5 y TYLCV. Estos tres ligandos del metal están situados en dos cadenas adyacentes dentro de la lámina β central. En el centro activo de TrwC y de Rep de AAV-5, la geometría de coordinación del ión metálico es tetraédrica. En ambas proteínas se ha

observado un ión Zn^{2+} coordinado por los tres ligandos, aunque en TrwC también se han obtenido cristales con Ni^{2+} y Cu^{2+} en el centro activo con la misma coordinación que el Zn^{2+} (Boer *et al.*, 2006). La situación en Tral es diferente, ya que aparece un ión Mg^{2+} coordinado por el triplete de His y tres moléculas de agua con una geometría octaédrica. Esto supone un caso excepcional, ya que las proteínas que unen Mg^{2+} o Mn^{2+} suelen tener un cuarto ligando proporcionado por un residuo ácido. Los metales divalentes como el Mg^{2+} o el Mn^{2+} aparecen con frecuencia como cofactores de nucleasas que no forman un intermedio covalente con el DNA cortado, y participan en la activación del ataque nucleofílico mediado por agua (Cowan, 1998). Dado que en las reacciones nucleolíticas donde el grupo -OH de una Tyr o Ser sirve como nucleófilo no hay una necesidad química aparente de activación por ión metálico, el requerimiento catalítico simultáneo de una Tyr y un metal divalente en el centro activo resulta confuso.

Para confirmar la unión directa del metal a la porción N-terminal de Rep de AAV-5, los autores realizaron experimentos de titulación por calorimetría isotérmica (ITC). Los datos obtenidos fueron compatibles con la existencia de un único sitio de unión a metales (Hickman *et al.*, 2002). Además, los resultados mostraron que la unión es exotérmica con una pequeña contribución entrópica al incremento de energía libre, lo que sugería que la unión del metal no causaba reordenamientos estructurales importantes (Hickman *et al.*, 2002). En el caso de TrwC, la unión del metal sí produce algunos reordenamientos en la proteína, como la estabilización del lazo entre la hélice α_1 y la cadena β_1 , o el desplazamiento de la cadena lateral del residuo catalítico Tyr 18 (Boer *et al.*, 2006).

Al igual que ocurre en Tral y TrwC, la sustitución de cualquiera de los dos residuos His del motivo HUH por Ala en Rep de AAV-5 supone la pérdida de la actividad de corte sobre DNA (Datta *et al.*, 2003; Guasch *et al.*, 2003; Hickman *et al.*, 2002), lo que demuestra la importancia de la unión del metal en la actividad nucleolítica de estas proteínas. El residuo Lys157 de Rep de AAV-5 es esencial para la catálisis, pero su substitución por Ala no afecta a la capacidad de unión del metal (Hickman *et al.*, 2002). En las topoisomerasas del tipo IA, que también forman un enlace 5'-fosfotirosina tras el corte del DNA, un conjunto de residuos básicos junto con la Tyr nucleofílica son suficientes para el corte del DNA, sin necesidad del ión metálico. La estructura de la topoisomerasa IA de *E. coli* unida a ssDNA muestra dos residuos cargados positivamente (Lys8 y Arg330) coordinando el enlace fosfato escindible desde dos lados opuestos del sitio activo (Changela *et al.*, 2001). La orientación de estos dos residuos en relación a la Tyr del centro activo es similar a la de la Lys157 y el Zn^{2+} en Rep de AAV-5. Los autores proponen que el Zn^{2+} actuaría de manera similar a Lys8 en la topoisomerasa, contribuyendo al correcto posicionamiento del fosfato escindible o a la estabilización del estado de transición, por lo que le atribuyen una función meramente estructural (Hickman *et al.*, 2002). En la estructura del dominio relaxasa de Tral en complejo con un ssDNA que contiene la secuencia del sitio de corte, se observó que la unión del ión metálico del centro activo, en este caso Mg^{2+} , estaba coordinada por los tres residuos His (los mismos que aparecen en la estructura sin DNA) y por dos oxígenos del fosfato escindible, en concreto el oxígeno

5' y uno de los oxígenos que no forman enlace. La interacción del metal con los oxígenos del fosfato contribuiría a la orientación del fosfato escindible relativa a la Tyr catalítica, a la vez que aumentaría la carga positiva parcial del fósforo para intensificar el ataque nucleofílico (Larkin *et al.*, 2005). La función del catión divalente en el centro activo de TrwC sería similar a la propuesta en Tral, de manera que el Zn^{2+} polarizaría el fosfato escindible facilitando el ataque nucleofílico por la Tyr catalítica (Boer *et al.*, 2006).

En resumen, y de acuerdo con lo anterior, el metal se requeriría en la reacción catalítica, ya sea en la polarización del fosfato escindible, o facilitando el ataque nucleofílico por la Tyr catalítica, o por la estabilización del intermedio de reacción pentacoordinado.

Elementos estructurales implicados en el reconocimiento del DNA.

Además de la actividad de transferencia de cadena de DNA, el dominio N-terminal de TrwC del plásmido R388 contiene los elementos estructurales encargados del reconocimiento específico del DNA del *oriT* (origen de transferencia). Para determinar la interacción de TrwC-N293 con el DNA se obtuvieron co-cristales de proteína unida a un oligo monocatenario 25-mer que contenía la secuencia del *oriT* de R388 situada a 5' del sitio corte. El extremo 5' de este DNA contenía una repetición invertida (IR₂) que podía plegarse y formar una estructura tipo horquilla, que mimetizaría uno de los brazos intracatenarios de una estructura cruciforme que se extruiría en el *oriT* plasmídico, seguida de un segmento de ssDNA que finaliza en la base anterior al sitio de corte. La estructura del co-cristal mostró que la superficie de interacción es altamente electropositiva y que define un surco a lo largo de una cara de la proteína donde se asienta el dsDNA de la horquilla. Esta superficie electropositiva continúa por debajo del segmento de DNA monocatenario formando una hendidura que contiene el sitio activo (Boer *et al.*, 2006; Guasch *et al.*, 2003). En el reconocimiento de la horquilla del cruciforme intervienen tres elementos estructurales, dos “β-ribbon” y un lazo que conecta una hélice α con una de las cadenas β que forman parte del núcleo estructural de la proteína, constituido por una lámina β con dos hélices α flanqueando una de sus caras. La interacción de uno de los “β-ribbon” se realiza mediante la inserción de una sola de sus cadenas en el surco mayor del DNA, en contraste con el típico motivo de unión a DNA “ribbon”-hélice-hélice, donde ambas cadenas del “ribbon” ocupan el surco mayor del dsDNA (Gomis-Ruth FX *et al.*, 1998). En el lado opuesto, tres residuos del lazo α-β penetran en el surco menor. El otro “β-ribbon” no penetra en el surco del dsDNA pero interacciona con el esqueleto azúcar-fosfato formando enlaces con los grupos fosfato del DNA. La interacción con la porción de ssDNA se establece mediante la formación de puentes de hidrógeno entre las bases del DNA y algunos residuos de la superficie de la proteína. El *oriT* del plásmido F contiene una secuencia IR situada a 5' del sitio de corte que podría formar una estructura cruciforme parecida a la del *oriT* del plásmido R388. Es probable que Tral se una a esta estructura de forma similar a como lo hace TrwC, aunque los intentos de co-cristalizar Tral con un oligo que mimetizara uno de los

brazos intracatenarios del posible cruciforme del *oriT* de F no dieron resultado (Larkin *et al.*, 2005). La estructura de la variante inactiva Tral36(Y16F) unida a un ssDNA 10-mer con la secuencia del *oriT* de F desde el final de la IR hasta dos bases a 3' del sitio de corte, mostró que el reconocimiento específico del DNA es del tipo “knob-into-hole”, ya que las bases del DNA encajan dentro de huecos o depresiones sobre la superficie de la proteína. La forma y composición de aminoácidos de estos huecos permite a la proteína discriminar las bases específicas, contribuyendo a la especificidad de secuencia observada experimentalmente (Stern and Schildbach, 2001). La naturaleza de esta interacción también explica cómo el cambio de unos pocos aminoácidos puede alterar la especificidad de unión al ssDNA de algunas relaxasas (Larkin *et al.*, 2005). También se observó el establecimiento de interacciones intramoleculares en el ssDNA, que son poco frecuentes, y que ayudan a estabilizar el complejo proteína-ssDNA (Larkin *et al.*, 2005).

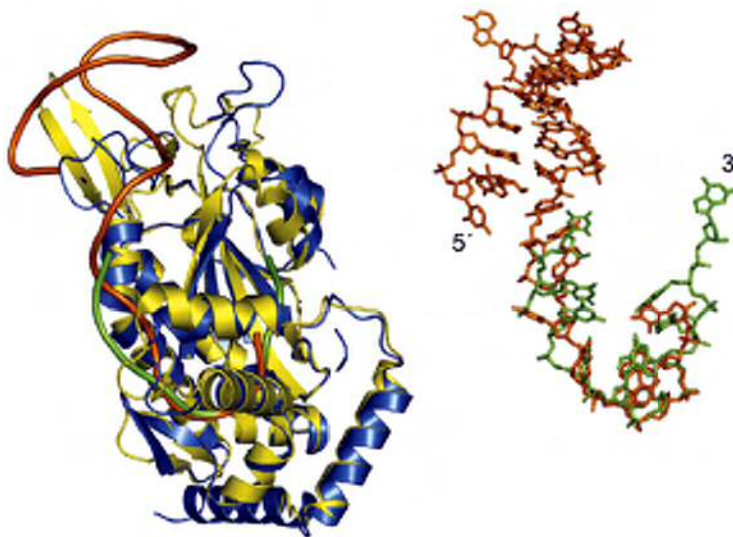


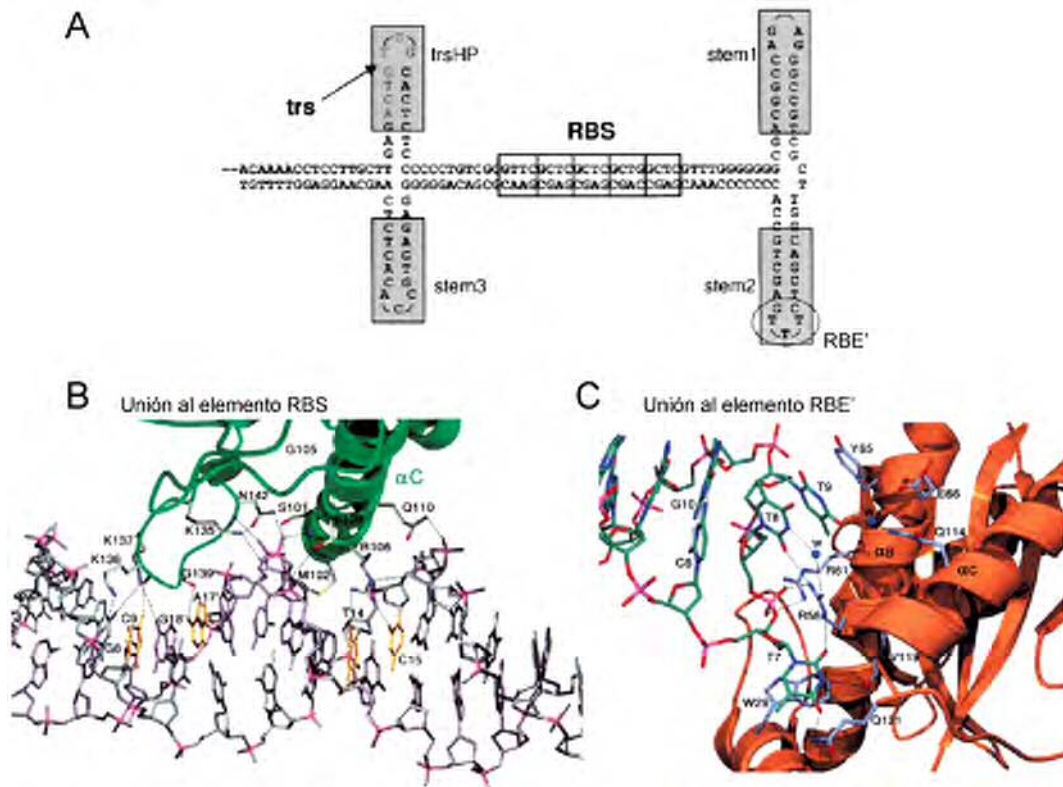
Figura 9. **Comparación de la conformación del DNA en la estructura de Tral de F y TrwC de R388.** En la figura se muestran alineados los complejos de Tral36 (proteína en azul; trazo del esqueleto del DNA en verde) y TrwC-N293 (proteína en amarillo; trazo del esqueleto del DNA en naranja). En la parte derecha se muestran las moléculas de DNA, con el mismo código de color, en forma de varillas.

Larkin C. *et al.* (2005). Structure.

La orientación general del ssDNA en las estructuras de TrwC y Tral es similar, ya que en ambas describe un giro en forma de “U” (unos 180 °C) antes de entrar en la cavidad del centro activo (Figura 9) (Boer *et al.*, 2006; Guasch *et al.*, 2003; Larkin *et al.*, 2005). En la estructura del complejo TrwC-N293:25-mer se observó que tres bases del ssDNA que forman parte de este giro en U constituyen una especie de cajón hidrofóbico que atrapa el residuo Met1.

El dominio N-terminal de la proteína Rep de AAV-5 contiene, además de la actividad endonucleasa específica, la actividad de unión a dsDNA específica de secuencia. En los extremos del genoma monocatenario viral se forman unas estructuras conocidas como repeticiones invertidas terminales (ITRs) que constituyen el origen de replicación viral. Dentro de las ITRs se encuentran dos secuencias necesarias para la replicación: el sitio de unión específico de Rep (RBS), que consiste en cinco repeticiones directas del motivo 5'-GCTC-3', y el sitio de resolución terminal (*trs*) (Figura 10 A). La replicación viral requiere la unión de Rep al RBS y el subsiguiente corte en el *trs*, que inicia el proceso de replicación de los extremos virales

para su conversión en dsDNA lineal. El corte en el *trs* está favorecido por la presencia en *cis* de una secuencia de cinco bases, denominada elemento RBE', localizada en el lazo de una de las estructuras tipo horquilla que se generan en el origen de replicación (Figura 10 A).



Hickman A. B. *et al.* (2002). *Molecular Cell*.

Figura 10. **Interacción de la proteína Rep de AAV-5 con el origen de replicación viral.** (A) Secuencia de la ITR de un extremo del genoma viral de AAV-5. La estructura “trsHP” contiene el sitio de resolución terminal o *trs*, donde Rep introduce un corte específico de cadena y secuencia (flecha). El sitio RBS contiene una serie de repeticiones directas (en recuadros). La actividad helicasa de Rep genera la estructura “trsHP” que se muestra, de manera que el sitio de corte queda en configuración monocatenaria. Los recuadros sombreados indican las estructuras con las que se ha comprobado la unión de Rep. (B) Interacciones del dominio N-terminal de uno de los monómeros de Rep por los surcos mayor y menor del DNA del sitio RBS. (C) Interacción del dominio N-terminal de Rep con el lazo (elemento RBE') de la estructura tipo horquilla “stem2” del origen de replicación.

La proteína Rep viral se caracteriza por utilizar dos superficies distintas de reconocimiento de DNA para coordinar la iniciación de la replicación (Hickman *et al.*, 2004). La unión al RBS implica dos elementos estructurales: la superficie del lazo entre las cadenas β_4 y β_5 , y la hélice αC , que se localizan a lo largo de uno de los bordes de la lámina β central. Cada monómero de Rep interacciona con el DNA de manera que con el lazo β_4 - β_5 contacta una repetición por el surco mayor, y con la hélice αC contacta con la repetición adyacente por el surco menor (Figura 10 B). Por tanto, cada repetición directa de cuatro bases está reconocida por los surcos mayor y menor por dos monómeros de Rep. Además, todos los monómeros se unen al RBS de manera que sus centros activos están orientados en dirección al *trs*. Por otra parte, la horquilla que contiene el elemento RBE' se une a una superficie de la proteína

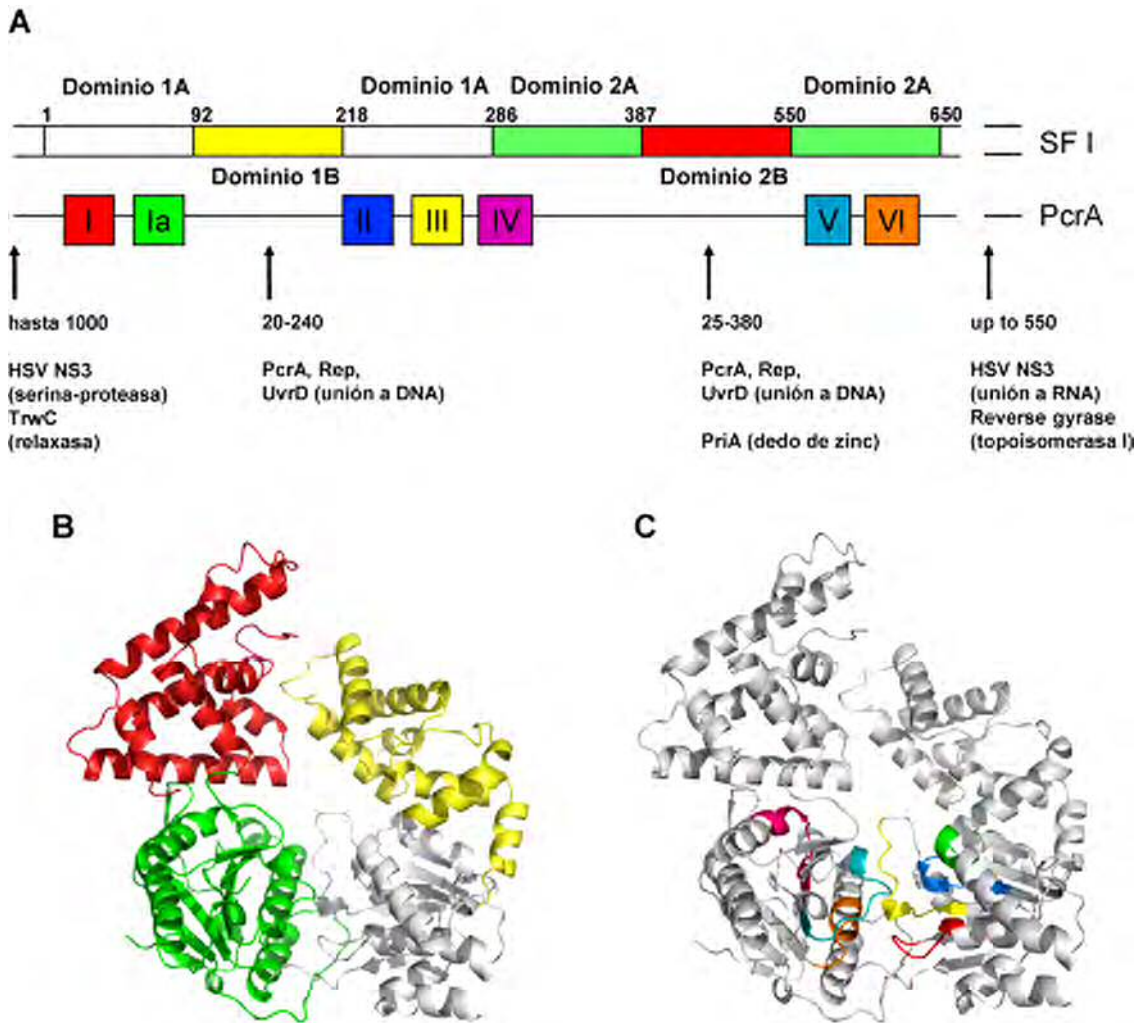
cargada positivamente, en el lado opuesto al centro activo (Figura 10 C). Esta unión no induce cambios significativos ni en Rep ni en su centro activo. Por esta razón, la estimulación que ejerce la unión de Rep al RBE' sobre el corte en el *trs* podría ser indirecta, facilitando la generación de un sustrato monocatenario (Hickman *et al.*, 2004).

4. LA HELICASA PcrA, OTRO COMPONENTE DEL COMPLEJO DE INICIACIÓN DE LA REPLICACIÓN PLASMÍDICA POR CÍRCULO RODANTE EN BACTERIAS GRAM-POSITIVAS.

Las helicasas: definición y clasificación.

Las helicasas son enzimas esenciales que catalizan el desenrollamiento de las bicadenas de ácidos nucleicos (AN). Las helicasas están presentes en todos los organismos e intervienen en diversos procesos celulares del metabolismo del DNA y el RNA como replicación (cromosómica y plasmídica), transcripción, traducción, procesamiento del RNA, recombinación y reparación (revisado en (Bird *et al.*, 1998a; Hall and Matson, 1999; Lohman and Bjornson, 1996; Mariani, 2000)). Esta utilización tan amplia explica que en *E. coli* se hayan identificado al menos 12 helicasas de DNA, y que más del 2% del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* codifique proteínas relacionadas con la actividad helicasa (Shiratori A *et al.*, 1999). La reacción central catalizada por las helicasas es siempre la misma: la hidrólisis de un nucleósido trifosfato (normalmente ATP) está acoplada a la separación de una bicadena de AN, ya sea DNA-DNA, DNA-RNA, o RNA-RNA.

Las helicasas se pueden clasificar de varias maneras. Una clasificación funcional muy utilizada se basa en la dirección de desenrollamiento. Originalmente, la polaridad de las helicasas se refirió a la dirección de la región de cadena sencilla requerida para iniciar el desenrollamiento. Por tanto, las helicasas 3'→5' requieren un sustrato bicatenario con un tallo monocatenario en 3', mientras que las helicasas 5'→3' requieren un tallo monocatenario en 5'. Sin embargo, hay algunas helicasas, como el sistema RecBCD de *E. coli* (Roman and Kowalczykowski, 1989), que son capaces de iniciar el desenrollamiento desde un sustrato con extremos romos. En este sentido, es más apropiado describir la dirección de desenrollamiento en función de la dirección de translocación de la helicasa sobre la cadena de AN. Además, esta definición es consistente con la primera e incluye todos los sistemas. También existen en la literatura ejemplos de helicasas que son capaces de iniciar la separación de la bicadena de AN en ambas direcciones, es decir, poseen actividad helicasa bipolar (Anand and Khan, 2004; Dillingham *et al.*, 2003).



Bird L. E. *et al.* (1998). *Current Opinion in Structural Biology*.

Figura 11. **La organización modular de las helicasas de las superfamilias SF1 y SF2.** (A) Esquema que muestra la organización modular de las helicasas de las superfamilias SF1 y SF2. Todas las helicasas pertenecientes a SF1 y SF2 tienen los dominios 1A y 2A, que podrían representar la unidad estructural básica de estas helicasas. Los motivos conservados en la superfamilia SF1 se muestran en relación con la estructura en dominios de PcrA. Las flechas indican regiones de la secuencia primaria donde se pueden encontrar inserciones de longitud variable en el rango que se indica. (B) Estructura de PcrA de *B. stearothermophilus* con los dominios coloreados como en A. (C) Estructura de PcrA de *B. stearothermophilus* con los motivos conservados coloreados como en A.

En base a su secuencia de aminoácidos las helicasas se agrupan en tres grandes superfamilias y dos familias menos representadas (Gorbalenya and Koonin, 1993). La mayoría de la helicasas pertenecen a las superfamilias SF1 y SF2, que incluyen proteínas codificadas por genes virales, procariotas, y eucariotas (Gorbalenya *et al.*, 1989; Gorbalenya and Koonin, 1993). Las helicasas que pertenecen a estas dos superfamilias se caracterizan por compartir un patrón similar de siete motivos de secuencia conservada. Los motivos helicasa (I, Ia, II, III, IV, V, y VI) están distribuidos a lo largo de la secuencia de aminoácidos y presentan una organización y estructura similares, formando un dominio central que proporciona las funciones catalíticas (Figura 11 A). En ambas familias, los motivos I y II corresponden a las secuencias

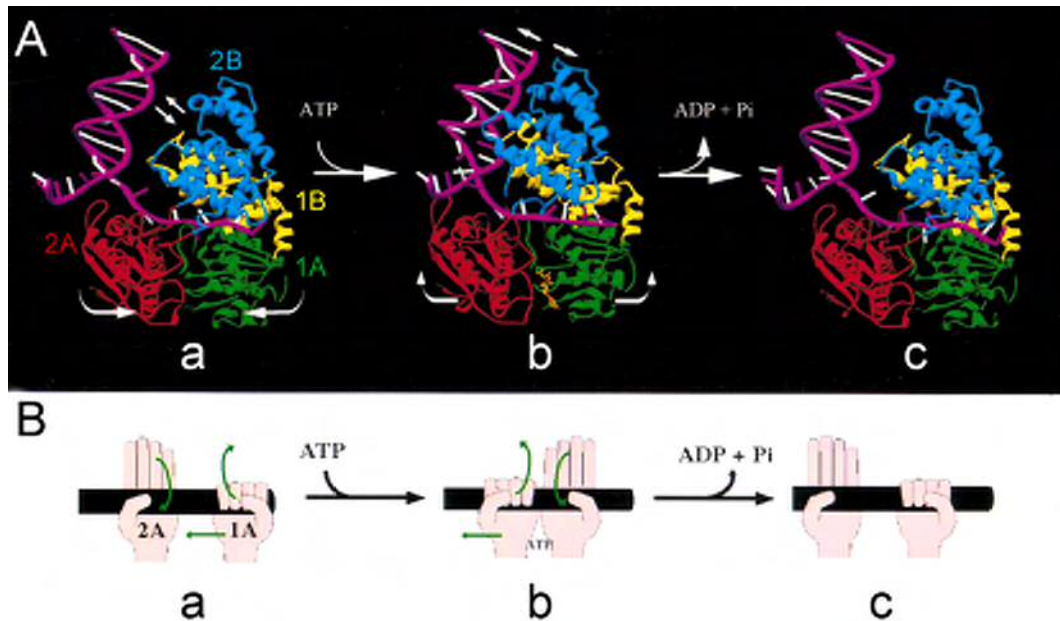
Walker A y B características de las ATPasas (Walker *et al.*, 1982). Otras secuencias de aminoácidos, que se localizan como inserciones entre los motivos conservados o en el extremo carboxilo, pueden formar parte de diferentes dominios que aportan funciones accesorias. Las enzimas de la superfamilia SF3, que normalmente provienen de virus de DNA y RNA, sólo contienen tres motivos conservados (I, II, y III), mientras que otras helicasas, como las hexaméricas tipo DnaB de *E. coli*, forman otro grupo distinto y más pequeño.

El análisis de las secuencias de los genomas de diferentes organismos ha permitido identificar, en un número considerable de marcos abiertos de lectura, alguno o todos los motivos helicasa característicos. Por tanto, los productos génicos correspondientes se han clasificado dentro de alguna de las familias descritas de helicasas. Sin embargo, sólo algunas de estas proteínas se han estudiado a nivel bioquímico, observándose que no todas, probablemente sólo una minoría, presentan verdadera actividad helicasa. Esta limitada actividad puede estar relacionada con el hecho de que los motivos helicasa son también característicos de las translocasas de AN. Estas enzimas dependientes de NTPs son capaces de moverse de manera unidireccional a lo largo de moléculas de AN (de cadena sencilla y doble). El motor molecular de las translocasas no sería necesariamente capaz, en sí mismo, de desenrollar cualquier dúplex de AN, y la actividad helicasa podría estar proporcionada por dominios adicionales, que no contienen los motivos helicasa, localizados fuera de la parte central de la proteína. En ocasiones, los dominios adicionales no proporcionan actividad helicasa a la proteína y pueden ser utilizados con otros propósitos. Otro aspecto a tener en cuenta es que para que las helicasas sean enzimas funcionales deben actuar acopladas dentro de complejos macromoleculares diseñados para desempeñar una operación particular (o conjunto de operaciones) sobre el AN bicatenario diana.

Estructura y mecanismo de actuación de la helicasa PcrA de Bacillus stearothermophilus.

En sus formas funcionales, las helicasas pueden tener una configuración monomérica, o ensamblarse para formar hexámeros, tetrámeros o dímeros (Lohman and Bjornson, 1996; Marians, 2000; Waksman *et al.*, 2000). PcrA de *Bacillus stearothermophilus* (en adelante PcrABst), perteneciente a la superfamilia SF1, fue la primera helicasa cuya estructura tridimensional se resolvió, y actuaría como un monómero (Subramanya *et al.*, 1996; Velankar *et al.*, 1999). PcrABst presenta actividad helicasa 3'→5', y posee cuatro dominios estructurales denominados 1A, 1B, 2A y 2B (Figura 11 A y B). Los dominios 1A y 2A contienen todos los motivos conservados y el sitio de unión a ATP (Figura 11 C). Su plegamiento estructural es similar al encontrado en la proteína RecA de *E. coli* (Story and Steitz, 1992). Esto hizo pensar que este dominio tipo RecA estaría presente, y en la misma posición, en la estructura de todas las helicasas (Bird *et al.*, 1998b). Aunque esto es cierto para la mayoría de las helicasas estudiadas, el plegamiento de estos dominios en las helicasas de la superfamilia SF2 guarda más relación con el de la adenilato quinasa

que con el de RecA. Algunos residuos de los motivos helicasa, localizados en ambos dominios, están implicados en la interacción con el ssDNA. Los estudios estructurales han mostrado que la hendidura que se forma entre los dominios 1A y 2A, que constituye el sitio de unión a nucleótidos, se cierra o se abre en respuesta a la unión o hidrólisis del NTP (Velankar *et al.*, 1999). Los dominios 1B y 2B, en cambio, están menos conservados y contribuirían a la especificidad por diferentes sustratos y actuarían en la desestabilización del dúplex de DNA (Soultanas *et al.*, 2000; Velankar *et al.*, 1999).



Velankar S. S. *et al.* (1999). *Cell*.

Figura 12. **Modelo del mecanismo helicasa de PcrA.** (A) Modelo para la actividad helicasa de PcrABst considerando los grandes cambios conformacionales en la proteína y en el sustrato de DNA. Los estados intermedios del modelo están basados en los datos estructurales, aunque el DNA se ha extendido por ambos extremos para indicar el tamaño máximo que se podría unir a la proteína. En el paso inicial de la reacción (a), la proteína está unida a un tallo de ssDNA pero no a la región dúplex del DNA. Tras la unión del ATP (b), sucede un cambio de conformación en la proteína, y la región dúplex del DNA se une a los dominios 1B y 2B, con el consiguiente desenrollamiento de varias bases en la conexión entre el ssDNA y el dsDNA. Finalmente (c), después de la hidrólisis del ATP, la proteína vuelve a la conformación inicial (a) y se transloca a lo largo del tallo de ssDNA. (B) El dibujo muestra la alternancia en la afinidad por el ssDNA de los dominios 1A y 2A durante la translocación. La mano abierta indica la pérdida de agarre sobre el DNA, y la mano cerrada muestra un agarre más fuerte. (a-c) corresponden a las mismas etapas del proceso que se describen en (A).

La resolución de la estructura de PcrABst en complejo con el sustrato de DNA, tanto unida a ADP (complejo producto) como a ADPNP (análogo no hidrolizable del ATP; complejo sustrato) (Velankar *et al.*, 1999), permitió determinar en detalle el mecanismo de translocación y desenrollamiento. La actividad de PcrA es el resultado de la combinación de dos funciones complementarias, pero estructuralmente distintas, de la proteína. El modelo propuesto implica un proceso activo en el cual la energía liberada de la hidrólisis de ATP es utilizada por el enzima en dos sentidos, uno para la translocación unidireccional y otro para la separación de las dos hebras del DNA,

procesos, ambos, energéticamente desfavorables (Figura 12). El DNA monocatenario se desliza a través de la superficie de los dominios 1A y 2A en dos pasos diferentes del ciclo. En el paso inicial, la proteína se uniría firmemente al ssDNA a través de su dominio 1A, aunque no a la región bicatenaria del DNA sustrato. Tras la unión del ATP se suceden una serie de cambios conformacionales en la proteína, que provocan el acercamiento de los dominios 1A y 2A, y la unión al dúplex de DNA a través de los dominios 1B y 2B. Este hecho provocaría el desapareamiento de varias bases en la conexión entre dsDNA y ssDNA. Finalmente, después de la hidrólisis del ATP, la proteína vuelve a la configuración inicial, lo que permite la translocación sobre una base del ssDNA y la liberación del dúplex de DNA. La distorsión inducida del DNA es un elemento fundamental en la reacción descrita anteriormente. Además del cierre de la hendidura entre los dominios 1A y 2A por la unión del ATP, ocurren otros cambios de conformación que alteran la posición relativa de los dominios 1B y 2B. De esta manera, la unión del ATP provocaría el movimiento de los dominios 1B y 2B para formar una superficie complementaria con la forma y la carga del dúplex de DNA. Finalmente, el impedimento estérico de los dominios 2A y 2B en el movimiento de translocación de PcrA sería suficiente para separar las dos cadenas de DNA. Según este modelo, la enzima se transloca y desenrolla 1 par de bases por molécula de ATP hidrolizada, es decir, su tamaño de paso es 1. No obstante, esta predicción, que ha sido confirmada mediante estudios cinéticos (Dillingham *et al.*, 2000), no es aplicable a todas las helicasas, ya que el número de bases abiertas en respuesta a la hidrólisis de una molécula de NTP puede ser distinto.

Dos modelos para explicar el mecanismo helicasa.

A pesar de la caracterización estructural y bioquímica de varias helicasas, incluidas algunas de la superfamilia SF1, el mecanismo que explicaría el desenrollamiento de las bicadenas de DNA o RNA sigue suscitando cierta controversia. Para explicar el mecanismo helicasa se han propuesto dos modelos generales: el modelo “inchworm” y el “active rolling” (Figura 13). En ambos mecanismos se requiere la hidrólisis de ATP, aunque no está definido en qué paso tiene lugar, y la unión del ATP parece estar asociada con un aumento de la afinidad por el dúplex de DNA o RNA. En el modelo “inchworm”, la helicasa separa el dúplex de DNA al moverse a lo largo de la molécula. El número de bases desapareadas en cada ciclo depende del grado de acoplamiento entre la hidrólisis del ATP y la actividad helicasa (4-5 pb es el número determinado para la helicasa UvrD (Ali and Lohman, 1997)). El modelo alternativo “active rolling” sugiere que la helicasa opera con una alternancia de la afinidad del enzima por ss- y dsDNA, controlada por la unión e hidrólisis de ATP. Por tanto, este modelo requiere una proteína oligomérica con subunidades que actúen cooperativamente en pares, donde cada subunidad sería capaz de unir ss- o ds-DNA, pero no ambos simultáneamente. Por el contrario, el modelo “inchworm” es consistente con cualquier estado oligomérico de la proteína, incluido el monómero, y plantea la unión simultánea de la proteína a ss- y dsDNA al menos en un punto durante la reacción. Además, el modelo “inchworm”, aunque es

compatible con tamaños de paso grandes, puede explicar una progresión de 1 base en cada ciclo, mientras que el modelo “active rolling” implica un mayor tamaño de paso, al menos tan grande como el sitio de unión individual de cada monómero.

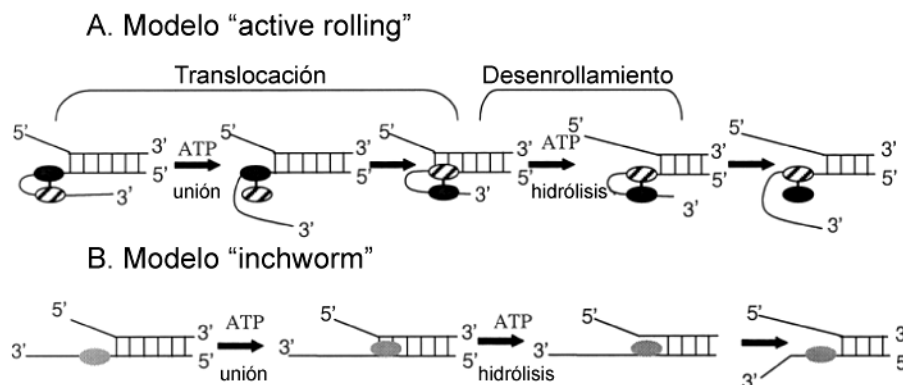


Figura 13. **Modelos para el mecanismo helicasa de DNA.** En ambos modelos es necesaria la hidrólisis del ATP, y la proteína helicasa se une y se transloca sobre el ssDNA. (A) Modelo “**active rolling**”. En el esquema, las dos subunidades del dímero son de diferente color para facilitar su identificación. La helicasa dimérica interacciona directamente con ss- y ds-DNA. Cada subunidad alterna su unión a dsDNA y a ssDNA a medida que el dímero se transloca. En este modelo, la translocación a lo largo del ssDNA está acoplada a la unión al ATP, mientras que la hidrólisis del ATP impulsa el desenrollamiento de varias bases de dsDNA en cada evento catalítico. (B) Modelo “**inchworm**”. Este modelo es consistente con el estado monomérico u oligomérico de la proteína. El monómero de helicasa se une a ssDNA y se transloca a lo largo de la cadena de DNA hasta llegar a la región del dúplex, probablemente por la unión del ATP. La desestabilización de la doble hélice y la liberación del ssDNA tienen lugar a medida que se hidroliza ATP.

El mecanismo propuesto para la actividad helicasa de PcrA en base a los datos estructurales supone el acoplamiento de la translocación sobre el ssDNA y la desestabilización del dúplex, e implica la unión simultánea de ds- y ssDNA a la misma subunidad de proteína, por lo que los autores proponen que PcrA actuaría según el modelo “inchworm” (Velankar *et al.*, 1999). Por otro lado, la caracterización estructural y bioquímica de otras helicasas de la superfamilia SF1, como las helicasas Rep y UvrD de *E. coli*, ha servido para intentar explicar su mecanismo de actividad helicasa. Ambas proteínas son helicasas 3'→5', y presentan un porcentaje de identidad de secuencia del 37%, y un porcentaje similar al compararlas con PcrABst. También presentan una elevada homología estructural con PcrA, ya que Rep y UvrD presentan cuatro dominios estructurales 1A, 2A, 1B y 2B, con los motivos implicados en la unión del NTP situados en la interfase de dos dominios del tipo RecA. Ambas proteínas se encuentran como monómeros en solución, mientras que la unión a ss o dsDNA induce su dimerización. Tanto en el caso de Rep como en el de UvrD se ha demostrado que la forma monomérica es inactiva en desenrollamiento del DNA, y que la oligomerización se requiere para la actividad helicasa *in vitro* (Cheng *et al.*, 2001; Ha *et al.*, 2002; Maluf *et al.*, 2003). La estructura tridimensional de Rep se obtuvo a partir de unos co-cristales en los que la unidad asimétrica estaba formada por dos monómeros de Rep unidos a la misma molécula de ssDNA 16-mer. Las subunidades de proteína se encontraban en dos conformaciones diferentes, “abierta” y “cerrada”,

que se diferenciaban por la rotación del dominio 2B (con un giro de unos 120°) sobre el dominio 2A. La orientación del dominio 2B en la forma cerrada de Rep sería parecida a la del mismo dominio en el complejo PcrA-DNA. El resto de los dominios, 1A, 2A y 1B, que establecen los contactos con el ssDNA, no variaban entre ambas conformaciones (Korolev *et al.*, 1997). A raíz de estos datos estructurales, y basándose en las implicaciones del movimiento rotacional del dominio 2B, los autores propusieron que Rep actuaría según el modelo “active rolling”, que además explicaría mejor los datos cinéticos obtenidos de la actividad helicasa de Rep. La importancia del dominio 2B en la actividad de Rep fue analizada posteriormente en un par de trabajos en los que se realizaron estudios funcionales con el mutante Rep Δ 2B, los cuales mostraron que el dominio 2B no es necesario para la actividad helicasa ni *in vivo* ni *in vitro*, y que la eliminación de este dominio restaura la actividad helicasa del monómero de Rep, aunque con una procesividad limitada (Brendza *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2002). Por tanto, el dominio 2B tendría un papel en la regulación de la actividad helicasa de Rep, ya que la formación del dímero de Rep elimina este efecto autoinhibitorio, alterando la conformación del dominio 2B. La pregunta que surge inevitablemente es: ¿cómo dos proteínas tan parecidas estructuralmente presentan dos mecanismos tan diferentes? Resulta evidente la necesidad de mayor información estructural y funcional sobre otras helicasas para demostrar la coexistencia de dos mecanismos diferentes en las helicasas de las superfamilias SF1 y SF2. No obstante, el modelo “inchworm” es igualmente aplicable a cada una de las subunidades del dímero de Rep, con la única premisa de que la oligomerización no sea fundamental *per se* en el mecanismo de actuación. De hecho, no se sabe con certeza si la oligomerización de Rep es necesaria para la activación de la helicasa *in vivo*, ya que es posible que la activación esté mediada por la interacción con otras proteínas accesorias. Este requerimiento de auto-asociación o hetero-asociación para la activación de la helicasa Rep puede constituir un mecanismo de regulación que responda a los cambios en los niveles de proteína en diferentes puntos del ciclo celular (Brendza *et al.*, 2005).

La reciente publicación de la estructura de un monómero de UvrD unido a un dúplex de DNA con un tallo monocatenario, ha aumentado más si cabe la controversia sobre el modelo de actividad helicasa y el papel del dominio 2B. La proteína adquiere la misma conformación que PcrA unida al mismo tipo de sustrato, con la molécula de DNA adoptando la misma forma de “L”, con el tallo monocatenario unido sobre los dominios 1A y 2A, casi perpendicular a la porción dúplex (Lee and Yang, 2006). Al igual que en PcrABst, la información obtenida a partir de la estructura de varios complejos ternarios UvrD-DNA-ADP (complejo producto) y UvrD-DNA-AMPPNP (complejo sustrato) permitió a los autores dilucidar el mecanismo helicasa de UvrD (Lee and Yang, 2006). El mecanismo helicasa propuesto para UvrD es una variante del modelo “inchworm” denominada “wrench-inchworm”. La unión del ATP provoca no sólo el cierre de la “hendidura” entre los dominios 2A y 1A, sino el movimiento de rotación y traslación de los tres dominios (1A, 1B y 2B) sobre el dominio 2A, lo que provoca la separación de un par de bases en la intersección ds-ssDNA. La liberación del ADP+Pi tras la hidrólisis del ATP conlleva la apertura de los dominios y la

translocación del ssDNA (Figura 14). Las diferencias fundamentales con el mecanismo helicasa de PcrA residen en el tipo de interacción con el dúplex y en las interacciones con el ssDNA durante la translocación. La interacción del dominio 2B de UvrD con el dúplex es esencial en este modelo, ya que la rotación del dominio 2B unido al dúplex tira del DNA hacia el dominio 2A en el punto de separación y provoca el desapareamiento de un par de bases (Figura 14). La translocación del ssDNA está regulada por una hélice “compuerta” cuyo movimiento está coordinado con el resto de los dominios. Es evidente que estos resultados entran en conflicto con las observaciones sobre el dominio 2B, que resulta dispensable para la actividad helicasa. En este trabajo sobre UvrD presentan mutantes en el dominio 2B con una capacidad de unión a dsDNA reducida que siguen presentando actividad helicasa. Aunque estos resultados van en contra del mecanismo “wrench-inchworm”, la helicasa podría cambiar a un mecanismo alternativo de “desplazamiento de cadena” cuando está afectada la unión a dsDNA (Lee and Yang, 2006). UvrD, al igual que PcrA y Rep, desempeñan funciones muy variadas, lo que puede explicar las diferencias en el mecanismo de actuación y en los componentes autorreguladores.

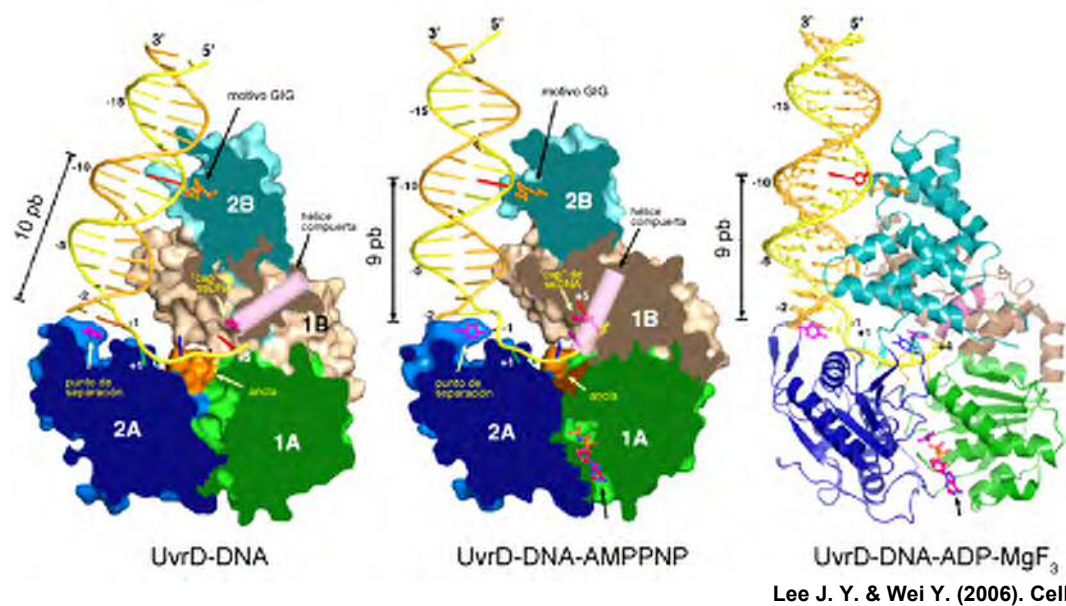


Figura 14. **Estructura de los complejos UvrD-DNA.** En la figura se muestra la estructura del complejo binario con DNA (UvrD-DNA), y de los complejos ternarios con AMPPNP (UvrD-DNA-AMPPNP) y con ADPMgF₃ (UvrD-DNA-ADP-MgF₃). En cada uno de los complejos se muestra la superficie molecular de la proteína sin la parte frontal para poder ver el DNA unido. También se indican las regiones con una función importante: en naranja se muestra el motivo GIG y el ancla, y en rosa fuerte el punto de separación, el “cap” de ssDNA y la hélice compuerta. El DNA se representa con un modelo tubular en los dos primeros complejos y con modelo de varillas en el último. La base del DNA que contacta con el motivo GIG se indica en rojo.

La función de PcrA en bacterias Gram-positivas.

El gen *pcrA* ha sido identificado en el genoma de varias bacterias Gram-positivas, como *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. A pesar de ser esencial en *B. subtilis* y *S. aureus*

(Iordanescu, 1993b; Petit *et al.*, 1998), se desconoce con exactitud qué función de PcrA es esencial para la célula. En mutantes condicionales de *pcrA* en *B. subtilis* se observó que, en comparación con los efectos que producía la depleción de la helicasa replicativa DnaC, la replicación del cromosoma sólo estaba ligeramente afectada (Petit *et al.*, 1998), lo que indica que PcrA no está implicada en la progresión de la horquilla replicativa. También en *B. subtilis* se han identificado mutantes supresores que permiten el crecimiento celular en ausencia de PcrA (Petit and Ehrlich, 2002). Estas mutaciones afectan a los genes *recF*, *recL*, *recO* y *recR*, que están implicados en el proceso de recombinación homóloga mediando la unión de RecA al DNA (Morimatsu and Kowalczykowski, 2003). Según indican estos resultados, una de las funciones que desempeñaría PcrA en bacterias Gram-positivas sería la de contrarrestar la toxicidad de las proteínas RecFLOR, promotoras de la recombinación, que interferirían en procesos celulares esenciales, como la replicación. PcrA podría intervenir en la resolución de estructuras de DNA bloqueadas por la recombinación y/o en la resolución de horquillas replicativas cuya progresión se hubiera interrumpido (Petit and Ehrlich, 2002). En ausencia de PcrA, estos intermedios de DNA podrían resultar tóxicos para la célula. Aunque PcrA no participa en la replicación del cromosoma, sí interviene en la replicación de plásmidos RC pertenecientes a las familias de pT181/pC221, pC194/pUB110 y pMV158/pE194 en *B. subtilis* y *S. aureus* (Chang *et al.*, 2002; Iordanescu, 1993a, 1993b; Petit *et al.*, 1998). Como ya hemos visto, PcrA presenta homología estructural con la helicasas de *E. coli* Rep, UvrD y con la subunidad B del complejo helicasa/nucleasa RecBCD (Gorbalenya and Koonin, 1993), todas ellas de la superfamilia SF1. Esta homología no sólo es a nivel estructural, ya que PcrA desempeña funciones similares a las de Rep y UvrD en *E. coli*. Rep es una helicasa no esencial que participa en la replicación RC de los bacteriófagos de cadena sencilla ϕ X174 y M13 (Takahashi *et al.*, 1978), y se piensa que interviene en la replicación del cromosoma. Los dobles mutantes de *E. coli* en los que están afectados *rep* y *uvrD* no son viables (Taucher-Scholtz *et al.*, 1983), por lo que la falta de una de las dos helicasas podría estar compensada, al menos en parte, por la actividad de la otra. UvrD participa en la reparación del DNA, en varias rutas de recombinación y, además, es la helicasa replicativa de varios plásmidos RC en *E. coli* (Bruand and Ehrlich, 2000). Estudios recientes han mostrado que tanto UvrD como Rep están implicadas en el procesamiento y liberación de horquillas replicativas dañadas (Flores *et al.*, 2005; Heller and Mariani, 2005), que son reconocidas por proteínas de los sistemas de recombinación, cuando no es necesario iniciar el proceso de recombinación homóloga. La función de ambas helicasas en estos procesos está relacionada con la regulación de la actividad de RecA. UvrD es capaz de desensamblar los filamentos de RecA, que se forman sobre las regiones de ssDNA de la horquilla dañada y que interrumpen la progresión de la replicación, permitiendo su reactivación (Veaute *et al.*, 2005). La actividad helicasa de Rep es capaz de limitar el ensamblaje de RecA sobre el ssDNA mediante el desenrollamiento de la cadena retrasada naciente, lo que permite la re-hibridación de las cadenas parentales y la progresión de la replicación (Heller and Mariani, 2005; Mahdi *et al.*, 2006).

En la práctica, una helicasa funcional siempre trabajará como un componente integrado dentro de un complejo macromolecular mayor que está diseñado para desempeñar una operación particular (o conjunto de operaciones) sobre el dsDNA diana. El mecanismo de iniciación de la replicación de plásmidos RC es un claro ejemplo donde PcrA sería integrante de un complejo macromolecular, constituido por proteínas y DNA, encargado de sintetizar la cadena líder. La iniciación de la replicación de plásmidos RC fue el proceso donde por primera vez se determinó una función concreta para PcrA. Los trabajos realizados por Iordanescu en *S. aureus* mostraron que un mutante del gen *pcrA*, denominado *pcrA3*, producía una fuerte disminución del número de copias del plásmido pT181 y la acumulación de formas de DNA circulares abiertas como consecuencia del corte mediado por la proteína iniciadora RepC en el origen de replicación plasmídico (Iordanescu, 1993b). El gen *pcrA* de *S. aureus* codifica una proteína de 730 aminoácidos (Iordanescu and Basheer, 1991; Iordanescu, 1993b). La proteína PcrA purificada de estafilococo (PcrASau) presenta actividad ATPasa estimulada por la presencia de ssDNA, y posee actividad helicasa en las dos direcciones ($3' \rightarrow 5'$ y $5' \rightarrow 3'$) (Anand and Khan, 2004). Aunque la función precisa de PcrASau en la viabilidad celular no se conoce, la capacidad de la proteína para reconocer sustratos de DNA con estructuras específicas, junto con su actividad helicasa bipolar, puede ser la clave para entender su función en diferentes procesos celulares (Anand and Khan, 2004). La interacción física entre PcrASau y la proteína iniciadora de la replicación RepC, codificada por pT181, se ha postulado como esencial para la iniciación de la replicación RC del plásmido. PcrASau es reclutada en el origen de replicación plasmídico a través de la interacción directa con la proteína iniciadora (RepC para pT181 y RepD para pC221), pudiendo así comenzar el desenrollamiento del DNA a partir del corte generado por Rep en el *dso*, que promueve la generación de una región de ssDNA en 5' (Chang *et al.*, 2002; Soultanas *et al.*, 1999). La capacidad de PcrASau para reconocer estructuras presentes en el DNA del *dso*, y su actividad helicasa bipolar, son consistentes con el papel de PcrA en el desenrollamiento del DNA para facilitar la progresión de la horquilla replicativa durante la replicación plasmídica RC (Dempsey *et al.*, 1992b; Jin *et al.*, 1997b; Jin and Novick, 2001; Koepsel *et al.*, 1985). La interacción entre PcrA y la proteína iniciadora en el origen de replicación de plásmidos RC no sólo implica el correcto reconocimiento del sustrato, sino que además afecta directamente a la actividad de la helicasa. El trabajo realizado con PcrA de *B. stearothermophilus* y la proteína iniciadora RepD del plásmido pC221 (Soultanas *et al.*, 1999) muestra que el resultado de la interacción entre ambas proteínas es un aumento de la procesividad de la helicasa. Este efecto estimulador parece específico para PcrA y es diferente del provocado por la proteína ribosomal L3 de *E. coli*, que promueve la unión cooperativa de PcrA a su DNA sustrato sin aumentar su procesividad (Soultanas *et al.*, 1998).

OBJETIVOS

La realización de esta tesis Doctoral se planteó con el objetivo general de ahondar en el conocimiento del mecanismo de la iniciación de la replicación por círculo rodante del plásmido pMV158 mediada por la proteína RepB que codifica el propio plásmido. Gracias al trabajo desarrollado previamente en el laboratorio sobre este tema sabíamos que RepB se une en el *dso* a una secuencia formada por tres repeticiones directas que constituyen el locus *bind*. También se había caracterizado la actividad de RepB sobre DNA superenrollado y sobre oligos monocatenarios, y se había demostrado que no forma un complejo covalente estable con el extremo 5' del DNA tras el corte específico de secuencia en el *dso*. Además, mediante mutagénesis dirigida se había determinado que el residuo Tyr99 era el responsable de la actividad catalítica de RepB. Por tanto, basándonos en estos antecedentes decidimos continuar el estudio con los siguientes objetivos generales:

1. Análisis de la interacción de RepB con el *dso* plasmídico. Determinación de los contactos de alta resolución que establece RepB con las distintas regiones del *dso* de pMV158, tanto en DNA lineal como en el plásmido superenrollado.
2. Caracterización estructural y bioquímica de RepB. Esta caracterización incluye el análisis de sus propiedades hidrodinámicas mediante ultracentrifugación analítica, y de sus propiedades espectroscópicas por dicroísmo circular y fluorescencia. Con ello pretendemos obtener información sobre su estado de oligomerización y sobre su composición en elementos de estructura secundaria, así como analizar su estabilidad térmica. También se pretende conocer la implicación de los metales divalentes en la estructura, estabilidad y actividad de RepB.
3. Determinación de la estructura tridimensional de RepB por cristalografía de rayos X y mediante la reconstrucción tridimensional de partículas de proteína por microscopía electrónica.
4. Análisis de la expresión del gen *pcrA* en su contexto genómico en *S. pneumoniae*.
5. Caracterización bioquímica de la helicasa PcrA de *S. pneumoniae*. Análisis de la interacción entre PcrA de *S. pneumoniae* y la proteína iniciadora de la replicación del plásmido pT181. Caracterización de su actividad en la replicación de plásmidos RC mediante el uso de sistemas de replicación *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

1. MATERIAL BIOLÓGICO: ESTIRPES BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS

1.1. Estirpes bacterianas.

Las estirpes bacterianas utilizadas en esta tesis, así como sus características genotípicas y su procedencia, se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Estirpes bacterianas

Estirpe bacteriana	Genotipo	Referencia
<i>S. pneumoniae</i> 708	<i>end-1 exo-1 trf-1 hex-4 malM594</i>	(Lacks and Greenberg, 1977)
<i>S. pneumoniae</i> R61	Derivado no capsulado de la estirpe D39 (serotipo 2)	(Lacks <i>et al.</i> , 1986)
<i>S. aureus</i> RN4220	Derivado de la estirpe NCTC8325, restricción y parcialmente <i>arg⁻</i> .	(Kreiwirth <i>et al.</i> , 1983)
<i>S. aureus</i> RN4220 <i>pcrA3</i>	Derivado con la mutación cromosómica <i>pcrA3</i>	(Iordanescu and Basheer, 1991)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	λ DE3 (<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>) F ⁻ <i>dcm ompT hsdS(r_B⁻m_B⁺) gal</i>	(Studier and Moffat, 1986)
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 (r_k⁻m_k⁺) supE44 Δ (lac-proAB) relA1 (F⁻ <i>traD36 proAB⁺ lacI^qΔM15</i>) λ⁻</i>	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
<i>E. coli</i> M15	Estirpe derivada de <i>E. coli</i> K12 que contiene el plásmido pREP4, el cual confiere resistencia a Km y expresa constitutivamente el represor <i>lacI</i>	Quiagen
<i>E. coli</i> TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> , (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZΔM15 ΔlacX74 deoR, recA1 araD139 Δ(ara leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> B834(DE3)	λ DE3 (<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>) F ⁻ <i>dcm ompT hsdS(r_B⁻m_B⁺) gal met</i>	(Studier and Moffat, 1986)

1.2. Plásmidos.

Los plásmidos utilizados, así como sus características más relevantes y su procedencia se recogen en la siguiente tabla:

Tabla 2. Plásmidos

Plásmido	Tamaño(pb)	Marcador	Características	Referencia
pMV158	5.536	Tc ^R	Plásmido natural de <i>S. agalactiae</i>	(Burdett, 1980)
pT181	4.437	Tc ^R	Plásmido natural de <i>S. aureus</i>	(Khan and Novick, 1983)
pT181- <i>cop608</i>	4.437	Tc ^R	Mutante de pT181 con alto número de copias	(Rasooly <i>et al.</i> , 1994)
pLS1	4.408	Tc ^R	Derivado ΔEcoRI B de pMV158 (Δ <i>mob</i>)	(Stassi <i>et al.</i> , 1981)
pCL1	4.930	Amp ^R	Derivado de pBR322 en el que se ha clonado el fragmento que contiene los promotores P _X y P _M del operon maltosa de <i>S. pneumoniae</i>	Laboratorio
pLS1R (pAPM22)	8.208	Em ^R	Derivado de pLS1 que contiene el gen <i>malR</i>	(Puyet <i>et al.</i> , 1993)
pLS1RO _{MX}	9.180	Em ^R	Clonaje del fragmento OMX en el sitio generado tras la doble digestión con EcoRI y BamHI de pLS1R	Este trabajo

pLS1RO _M	8.980	Em ^R	Eliminación del promotor P _x de la construcción pLS1RO _{MX}	Este trabajo
pLS1RO _{MX} pcrA-S	9.600	Em ^R	Clonaje del fragmento pcrA-400 N en el sitio BamHI del plásmido pLS1RO _{MX} , en la orientación del promotor P _M	Este trabajo
pLS1RO _{MX} pcrA-AS	9.600	Em ^R	Clonaje del fragmento pcrA-400 N en el sitio BamHI del plásmido pLS1RO _{MX} , en la orientación contraria al promotor P _M	Este trabajo
pLS1RO _M MCS	~8.500	Em ^R	Clonaje del fragmento MCS en el sitio BamHI del plásmido pLS1RO _M	Este trabajo
pGEM-T	3.000	Amp ^R	Vector de clonaje y expresión	Promega
pGEMrepB1	3.750	Amp ^R	Clonaje del fragmento de PCR repB en el vector pGEM-T (orientación a)	Este trabajo
pCR [®] 2.1	3.929	Amp ^R Km ^R	Vector de clonaje y expresión	Invitrogen
pCR2.1PN	6.249	Amp ^R Km ^R	Clonaje del fragmento pcrAPN en el vector pCR2.1 mediante la tecnología TOPO T/A de Invitrogen	Este trabajo
pCR [®] 2.1C	5.000	Amp ^R Km ^r Cm ^R	Fragmento Sau3AI de pJS3, que contiene el gen <i>cat</i> , clonado en el sitio BamHI de pCR2.1 (orientación a)	Este trabajo
pCR2.11	5.752	Amp ^R Km ^R Cm ^R	Clonaje del fragmento Δ3'pcrA en el vector pCR2.1 mediante la tecnología TOPO T/A de Invitrogen	Este trabajo
pCR2.12	5.749	Amp ^R Km ^R Cm ^R	Clonaje del fragmento Δ5'pcrA en el vector pCR2.1 mediante la tecnología TOPO T/A de Invitrogen	Este trabajo
pCR2.13	5.239	Amp ^R Km ^R Cm ^R	Clonaje del fragmento Δ5'3'pcrA en el vector pCR2.1 mediante la tecnología TOPO T/A de Invitrogen	Este trabajo
pCR2.1C1	6.823	Amp ^R Km ^R Cm ^R	Clonaje del fragmento Δ3'pcrA (generado por digestión con EcoRI de pCR2.11) en el sitio EcoRI de pCR2.1C	Este trabajo
pCR2.1C2	6.820	Amp ^R Km ^R Cm ^R	Clonaje del fragmento Δ5'pcrA (generado por digestión con EcoRI de pCR2.12) en el sitio EcoRI de pCR2.1C	Este trabajo
pCR2.1C3	6.310	Amp ^R Km ^R Cm ^R	Clonaje del fragmento Δ5'3'pcrA (generado por digestión con EcoRI de pCR2.13) en el sitio EcoRI de pCR2.1C	Este trabajo
pQE30	3.460	Amp ^R	Vector de clonaje y expresión utilizado para generar proteínas con la etiqueta His ₆ en su extremo amino	Quiagen
pQE30PA	5.700	Amp ^R Km ^R	Construcción que contiene el marco de lectura del gen <i>pcrA</i> de <i>S. aureus</i> , para generar PcrASau con la etiqueta His ₆ en su extremo amino	(Chang <i>et al.</i> , 2002)
pQE30PN	5.860	Amp ^R Km ^R	Clonaje del fragmento HispcrASpn en el sitio KpnI de pQE30	Este trabajo
pJS3	4.191	Cm ^R	Plásmido derivado de pLS1, que tiene el gen <i>cat</i> de pC194 acoplado al promotor P _{tet}	(Ballester <i>et al.</i> , 1986)
pBEND2	~2.693	Amp ^R	Vector de clonaje basado en pBR322	(Kim <i>et al.</i> , 1989)
pBEND2bind	~2.816	Amp ^R	Clonaje del fragmento de PCR locus <i>bind</i> en el sitio Sall de pBend2	Este trabajo
pBEND2nic	~2.814	Amp ^R	Clonaje del fragmento de PCR locus <i>nic</i> en el sitio Sall de pBend2	Este trabajo

Orientación a: clonado según la dirección de la expresión dirigida por el promotor $\phi 10$ del fago T7.

2. MEDIOS DE CULTIVO

2.1. Medio de cultivo para *S. pneumoniae*.

Para el crecimiento de *S. pneumoniae* en medio líquido se utilizó el medio AGCH (Lacks, 1966) suplementado, en el momento de inocular, con 0,3% de sacarosa y 0,2% de extracto de levadura. Se añadieron los siguientes antibióticos a las concentraciones finales indicadas: tetraciclina (Tc) 1 µg/ml, eritromicina (Em) 1 µg/ml, cloramfenicol (Cm) 1-2 µg/ml. Para el crecimiento en medio sólido, se mezclaron las células y los antibióticos correspondientes en una capa basal compuesta por AGCH, sacarosa al 0,3%, extracto de levadura al 0,2% y bacto-agar al 1%. Esta capa se cubrió con otra superficial compuesta también por AGCH pero con 0,75% de bacto-agar.

2.2. Medio de cultivo para *E. coli*.

Para el crecimiento de las estirpes de *E. coli* se utilizó el medio TY (Maniatis, 1982), suplementado con los siguientes antibióticos a las concentraciones indicadas: ampicilina (Ap) 100-200 µg/ml y kanamicina (Km) 50 µg/ml. Para el crecimiento en medio sólido, se añadió al medio TY bacto-agar al 1,5% y los mismos antibióticos a las concentraciones indicadas anteriormente. Para la puesta en competencia y transformación de las estirpes de *E. coli* se utilizó el medio SOB (Hanahan, 1983). En la transformación por electroporación, se utilizó el medio SOC (medio SOB suplementado con 20 mM de glucosa) para la recuperación de las células.

Los cultivos de *E. coli* utilizados en la sobreproducción y purificación de proteínas se crecieron en el medio mínimo M9 (Miller, 1972), que se completó con: 2 mM MgSO₄, 0,2% glucosa y el antibiótico correspondiente. Para el crecimiento de la estirpe de *E. coli* B834(DE3), auxótrofa para metionina, se utilizó el medio mínimo M9 suplementado con 2 mM MgSO₄, 0,2% glucosa, 9 µM FeSO₄·7H₂O, los 19 aminoácidos, excepto la metionina, a una concentración de 40 µg/ml, las siguientes vitaminas a una concentración de 1 µg/ml: riboflavina, niacinamida, piridoxina y tiamina, seleno-L-metionina a una concentración de 40 µg/ml, y el antibiótico correspondiente.

2.3. Medio de cultivo para *S. aureus*.

Los cultivos de *S. aureus* se crecieron en medio líquido Brain-Heart (Difco).

3. FRAGMENTOS DE DNA Y OLIGONUCLEÓTIDOS

3.1. Fragmentos de DNA.

En la Tabla 3 se muestran los fragmentos de DNA utilizados en esta tesis, así como sus características y utilización.

Tabla 3. Fragmentos de DNA

Nombre	Tamaño (pb)	Obtención	Características	Procedencia	Utilización
repB	700	Por PCR del plásmido pMV158 con los oligos REP y CREP2	Fragmento que contiene el gen <i>repB</i>	Este trabajo	Clonaje del gen <i>repB</i> en el vector de expresión pGEM-T
HispcrASpn	2.290	Por PCR de DNA cromosómico con los oligos HisAN e HisAC	Fragmento que contiene el marco de lectura (a partir del segundo codón) del gen <i>pcrA</i> de <i>S. pneumoniae</i> . Los oligos utilizados en la PCR añaden en cada extremo la secuencia diana de KpnI	Este trabajo	Clonaje en el vector pQE30 para la sobreproducción de His ₆ -PcrASpn
pcrASpn	2.320	Por PCR de DNA cromosómico con los oligos pcrA1 y pcrA2	Fragmento que contiene el gen <i>pcrA</i> de <i>S. pneumoniae</i> sin su propio promotor pero con la secuencia SD.	Este trabajo	Purificación de PcrA de neumococo
pcrAPN	2.400	Por PCR de DNA cromosómico con los oligos INS1 y pcrA2	Fragmento que contiene el gen <i>pcrA</i> de <i>S. pneumoniae</i> incluido el promotor Pa	Este trabajo	Experimentos de extensión del cebador
pcrA-400 N	430	Procede de la digestión del plásmido pCR2.1PN con BamHI	Fragmento que contiene las primeras 400 pb del gen <i>pcrA</i> incluida la secuencia SD	Este trabajo	Experimentos de expresión de RNA antisentido
Δ5' 3'pcrA	1.278	Por PCR de DNA cromosómico con los oligos INS2 e INS3	Fragmento interno de <i>pcrA</i> al que le faltan 526 pb del extremo 5' y 516 pb del extremo 3'	Este trabajo	Clonaje en el vector pCR2.1
Δ5'pcrA	1.794	Por PCR de DNA cromosómico con los oligos INS2 y pcrA2	Fragmento interno de <i>pcrA</i> al que le faltan 526 pb del extremo 5'	Este trabajo	Clonaje en el vector pCR2.1
Δ3'pcrA	1.804	Por PCR de DNA cromosómico con los oligos pcrA1 e INS3	Fragmento interno de <i>pcrA</i> al que le faltan 516 pb del extremo 3'	Este trabajo	Clonaje en el vector pCR2.1
OXM	1.000	Procede de la doble digestión Sall-SspI de pCL1	Fragmento que contiene los promotores P _M y P _X del regulón de la maltosa en <i>S. pneumoniae</i>	Laboratorio	Construcción del vector pLS1RO _{MX}
MCS	41	Anillamiento de los oligos MCS-UP y MCS-DOWN	Fragmento que contiene un sitio de clonaje múltiple	Este trabajo	Construcción del vector pLS1RO _M MCS

<i>dso</i> entero	232	Por PCR del plásmido pMV158 con los oligos <i>dso1</i> y <i>dso4</i>	Fragmento que contiene el <i>dso</i> entero	Este trabajo	EMSA, footprinting
locus <i>nic</i>	121	Por PCR del plásmido pMV158 con los oligos <i>dso1</i> y <i>dso2</i>	Fragmento que contiene la secuencia de región <i>nic</i>	Este trabajo	EMSA, footprinting, vida media, y análisis de la curvatura
locus <i>bind</i> o 123- <i>bind</i>	123	Por PCR del plásmido pMV158 con los oligos <i>dso3</i> y <i>dso4</i>	Fragmento que contiene la secuencia de la región <i>bind</i>	Este trabajo	EMSA, footprinting, vida media, y análisis de la curvatura
42- <i>bind</i>	42	Anillamiento de los oligos OB1 y OB1.1	Incluye la secuencia de las tres repeticiones directas de 11 pb o DDR	Este trabajo	EMSA y microscopía electrónica
FAD	346	Por PCR del plásmido pMV158 con los oligos <i>dso1</i> y FAD	Fragmento de DNA que incluye el <i>dso</i> y una secuencia del plásmido no relacionada	Este trabajo	Afinidad relativa
1825	1.825	Digestión de pMV158 con <i>StuI</i> y <i>BstXI</i>	Fragmento de DNA de pMV158 que incluye el <i>dso</i> de pMV158	Este trabajo	Microscopía electrónica
700	700	Digestión de pMV158 con <i>BanI</i> y <i>BstXI</i>	Fragmento de DNA de pMV158 que incluye el <i>dso</i> de pMV158	Este trabajo	Microscopía electrónica
A	-	Anillamiento oligos I0332 y I0333	Dúplex con un tallo protuberante en el extremo 3'	(Anand and Khan, 2004)	Actividades de unión y helicasa de PcrASpn
B	-	Anillamiento oligos I0332 y I0372	Dúplex con un tallo protuberante en el extremo 5'	(Anand and Khan, 2004)	Actividades de unión y helicasa de PcrASpn
C	-	Anillamiento oligos G9858 y G0179	Dúplex con una horquilla en la cadena 5'→3', un tallo protuberante en el extremo 5', y un nucleótido desapareado en 3'	(Anand and Khan, 2004)	Actividades de unión y helicasa de PcrASpn
D	-	Anillamiento oligos I0255 y I042	Dúplex con una horquilla en la cadena 3'→5', un tallo protuberante en el extremo 3', y un nucleótido desapareado en 5'	(Anand and Khan, 2004)	Actividades de unión y helicasa de PcrASpn

3.2. Oligonucleótidos.

En la Tabla 4 se muestra la secuencia y utilización de los oligos empleados en este trabajo. Los oligos fueron sintetizados, y purificados por HPLC, en el Servicio de Química de Proteínas del CIB. Los oligos marcados con un asterisco fueron purificados de gel con el procedimiento que se describe en el apartado 1.5 de Métodos. La concentración de los oligos se calculó por su medida de absorbancia a 260 nm y considerando la relación A_{260} /concentración proporcionada por el programa OLIGO.

Tabla 4. Oligonucleótidos

Nombre	Tamaño(nt)	Secuencia 5'-3'	Utilización
pcr1	40	GGATTCCATATGGAATTCCTTAGATTTTTTCTCAATTG	PCR
pcrA1	32	CCGGAATTCGGTATTGACTTCAAGAGTAAGG	PCR
pcrA2	32	CGGGGTACCCCGGTACATAAAAATCCTCCTCA	PCR
dso1	20	AGGGAGATGTTGTGGGGGAT	PCR
dso2	20	CAGCTCTAAGGATAAAGGCG	PCR
dso3	20	CCTTAGAGCTGCAAGGGTTT	PCR
dso4	20	GCATAACCGTGCACTCAATC	PCR
OB1*	42	AATCTCGGCGACTTTTCGGCGACTTTTCGGCGACTTTT TAGA	Anillamiento con oligo OB1.1
OB1.1*	42	TCTAAAAAGTCGCCGAAAAGTCGCCGAAAAGTCGCCGAGATT	Anillamiento con oligo OB1
FAD	21	GATAACCCCATCTCTCTTGC	PCR
INS1	20	TGCTACTCCCCGTAAAGTTT	PCR
INS2/pcrAc	20	CAGTGTTATACAGCCTATCA	PCR
INS3	20	CATCTGGATCTTCAGTCGCA	PCR
INS4/gspa	20	GTTTAGGCTCGTTGATAATA	PCR y RT-PCR
gspb	22	CTCTTTGACTATGTCGTTAATG	RT-PCR
REP	20	GGCAGGCACTGGCTAAAGTC	PCR
CREP2	20	TCTTTTCTTCATCATCGGTC	PCR
PEXT	18	TTGCACCGCCTCAGCCTG	Extensión del cebador
pfx23	23	TGCTTCCGTACTACGACCCCCCA	Actividad de RepB
HisAN*	40	ACTGGGTACCAACGCATTATTAAATGGAATGAATGACCGT	PCR
HisAC*	40	ACTGGGTACCGATTTTTTTCTCAATTGGAGCCACACTGGC	PCR
MCSUP*	41	GATCAAGCTTCCGCGGGCCCGGCATGCGGCCGCACTAGTG	Anillamiento con oligo MCSDOWN
MCSDOWN*	41	GATCCACTAGTGCGGCCGCATGCCCGGGCCCGCGGAAGCTT	Anillamiento con oligo MCSUP
pcrAT7*	40	TAATACGACTCACTATAGGGGACTTAAAGAGTAAGGAAGA	Síntesis de RNA
I0332	18	GCCTCGCTGCCGTCGCCA	Anillamiento con oligo IO333
I0333	38	TGGCGACGGCAGCGAGGCTTTTTTTTTTTTTTTTTT	Anillamiento con oligo IO332
I0372	38	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCGACGGCAGCGAGGC	Anillamiento con oligo IO332
I0255	30	GTGGACGCACATACTGTGTGCATATGGATC	Anillamiento con oligo IO42
I042	53	TATGCACACAGTATGTGCGTCCAACCGGCTATTAGAGTAG CCGGTTTGATCC	Anillamiento con oligo I0255
G9858	26	CATATGCACACAGTATGTGCGTCCAG	Anillamiento con oligo GO179
G0179	53	GATCCAATCGGCCATTAGAGTGGCCGATTGGACGCACATA CTGTGTGCATATG	Anillamiento con oligo G9858

4. ENZIMAS

Las enzimas de restricción, el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*, la ligasa del fago T4, la fosfatasa alcalina de intestino de ternera, la polinucleótido quinasa del fago T4, la RNA polimerasa del fago T7 y la DNasa I de páncreas bovino fueron suministradas por las firmas comerciales New England Biolabs y Roche. Las DNA polimerasas utilizadas en la amplificación por PCR (*Taq*, DNAzyme y *Pfu*) fueron suministradas por Invitrogen, Fynzimes y Stratagen. De Promega se adquirió la transcriptasa reversa AMV, y de Invitrogen, la transcriptasa reversa Thermoscript. Otras enzimas utilizadas (proteínasa K, RNasa A, lisozima, seroalbúmina bovina (BSA), lisostafina y lisozima) fueron suministradas por Sigma.

5. PRODUCTOS QUÍMICOS Y REACTIVOS

Los componentes de los medios de cultivo se obtuvieron de Pronadisa, Merck, Sigma, BD y Difco. De Sigma se adquirieron: Cm, Em, Tc, polietilenimina, permanganato potásico y la resina HIS-select. El material para cromatografía en capa fina también fue adquirido de Sigma. Roche suministró: Ap, y los rNTPs y dNTPs no radiactivos. De Amersham, el shepadex G-50, las columnas Microspin G-25, el kit de secuenciación de DNA, el material para cromatografía y los nucleótidos radiactivos. Los siguientes productos: agarosa, acrilamida, bisacrilamida, TEMED, persulfato amónico, β -mercaptoetanol (β -ME), SDS, triton X-100, Commassie Bio-safe, resina de agarosa-heparina y membranas de PVDF, fueron suministrados por Bio-Rad. Para la purificación de fragmentos de DNA de agarosa se utilizó el kit QIAquick de Quiagen. Para las preparaciones de DNA plasmídico se utilizó el kit Midiprep de Genomed. Los filtros de nitrocelulosa para el filtrado de soluciones fueron suministrados por Millipore. Las membranas para diálisis se obtuvieron de Spectrum, y las diapositivas de diálisis, de Pierce. Para las autorradiografías se usaron películas X-Omat S de Kodak. Las pantallas amplificadoras empleadas fueron Cronex Ligthingplus de Dupont.

6. TAMPONES

Las soluciones y tampones utilizados en esta tesis se describen en la Tabla 5. La composición de otras soluciones que sean específicas de una técnica se citarán en el apartado correspondiente del Capítulo de Métodos.

Tabla 5. Descripción de los tampones utilizados y su aplicación

Nombre	Composición	Aplicación
Tampón TE (10:1)	Tris-HCl 10 mM pH 8,0 EDTA 1mM	
Tampón TAE	Tris base 40 mM Acido acético 20 mM EDTA 2 mM El pH resultante es 8,1	Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Tampón TBE	Tris base 89 mM Acido bórico 89 mM EDTA 2,5 mM El pH resultante es 8,3	Electroforesis de DNA en geles de agarosa y PAA
Tampón TG	Tris-HCl 50 mM pH 8,3 Glicina 300 mM SDS 0,1% EDTA 2 mM	Electroforesis de proteínas en geles de PAA/SDS. Electrotransferencia de proteínas a membranas de PVDF suplementado con un 20% de metanol.
Tampón de carga SLB 5X	Tris-HCl 250 mM pH 8,8 SDS 5% EDTA 10mM β -ME 25% Glicerol 50% Azul de bromofenol 1 mg/ml	Tampón de carga para electroforesis de proteínas en geles de PAA/SDS
Colorante de carga SBE 3X	Sacarosa 30% Azul de bromofenol 0,075% EDTA 2,5 mM	Tampón de carga para electroforesis de DNA
Colorante de carga BXGE 10X	Azul de bromofenol 0,075% Xilencianol 0,25% Glicerol 60% EDTA 10 mM	Tampón de carga para electroforesis de DNA
Tampón CD	20 mM HEPES pH 8 4,5% sulfato amónico Etilenglicol 5%	Para dicroísmo circular de proteínas
Tampón B	Tris-HCl 20 mM pH 8,1 EDTA 1 mM DTT 5 mM KCl 300 mM	Tampón de reacción para la actividad de RepB
Tampón H	Tris-HCl 20 mM pH 8,1 EDTA 1 mM DTT 5 mM Etilenglicol 5%	Tampón para la purificación de RepB. Se suplementa con KCl a distintas concentraciones
Tampón E	Tris-HCl 20 mM pH 7,6 NaCl 200 mM EDTA 2 mM	Elución de fragmentos de DNA de geles de PAA
Tampón EO	Acetato amónico 500 mM pH 7,5 Acetato magnésico 10 mM SDS 0,1%	Elución de oligos de geles de PAA desnaturalizantes
Tampón ME	Tea-HCl pH 7,5 $MgCl_2$ 10 mM	Adsorción de la muestra al soporte de mica en microscopía electrónica
Colorante de carga BXF1X	Formamida desionizada 80% NaOH 10 mM Azul de bromofenol 0,1% Xilencianol 0,1% EDTA 1 mM	Tampón de carga para electroforesis de DNA en geles de PAA desnaturalizantes
Tampón AN	Tris-HCl 1M pH 8,0 EDTA 1 mM NaCl 100 mM	Anillamiento de oligos
Tampón TBS	Tris-HCl 20 mM pH 7,5 NaCl 500 mM	Ensayos de "Western-blot"
Tampón TBST	Tris-HCl 20 mM pH 7,5 NaCl 500 mM Tween-20 0,1%	Ensayos de "Western-blot"
Tampón UA	Tampón H con el DTT reducido a 0,1 mM, suplementado con 450 mM de KCl	Ensayos de ultracentrifugación analítica
Tampón TEKEM 1X	Tris-HCl 10 mM pH 8,0 EDTA 1 mM $Mg(OAc)_2$ 10 mM	Tampón de reacción para la actividad de PcrA

	Etilenglicol 10% KCl 100 mM	
Tampón HEL	Tris-HCl 20 mM pH 7,5 KCl 100 mM MgCl ₂ 3 mM ATP 3 mM DTT 5 mM Glicerol 10%	Tampón de reacción par la actividad helicasa de PcrA
Tampón LIS	Tris-HCl 50 mM pH 7,5 Triton X-100 0,1% β-ME 20 mM Etilenglicol 10% NaCl 200 mM Imidazol 10 mM	Tampón de lisis celular para la purificación de His ₆ -PcrA
Tampón ELU	Tampón LIS sin Triton X-100 y con Imidazol 200 mM	Tampón de elución en la purificación de His ₆ -PcrA
Tampón TEG	Tris-HCl 25 mM pH 8,0 EGTA 5 mM	Preparación de extractos de replicación
Tampón TDE	Tris-HCl 10 mM pH 8,0 EDTA 1 mM KCl 100 mM DTT 1 mM Etilenglicol 10%	Preparación de extractos de replicación
Tampón RE 10X	Tris-HCl 40 mM pH 8,0 KCl 100 mM Mg(OAc) ₂ 12 mM DTT 1 mM Etilenglicol 5% (v/v) ATP 2mM UTP, CTP, y GTP 0,5 mM de cada uno dTTP, dGTP y dCTP 50 μM NAD 50 μM cAMP 50 μM	Tampón de reacción en los ensayos de replicación <i>in vitro</i> de pT181 en extractos libres de células
Tampón DP 1X	Tris-HCl 20 mM pH 7,5 DTT 1 mM EDTA 0,5 mM NaCl 200 mM Glicerol 10%	Tampón de dilución de la DNA polimerasa DNaE
Tampón RP 1X	Tris-HCl 20 mM pH 7,5 DTT 0,5 mM EDTA 0,1 mM MgCl ₂ 50 mM BSA 40 μg/ml Glicerol 4%	Ensayos de replicación <i>in vitro</i> de pT181 con la DNA polimerasa DNaE
Tampón de permabilización	Hepes 50 mM pH 8,0 EDTA 10 mM Sacarosa 20%	Experimentos de entrecruzamiento

7. SOPORTE INFORMÁTICO

Las imágenes de geles con DNA marcado radiactivamente fueron adquiridas con el sistema “Phosphorimager” FLA-3000 de Fujifilm. Estas imágenes fueron analizadas con los programas “ImageGauge” de Fujifilm y QuantityOne de Bio-Rad. Las imágenes de geles de DNA teñidos con bromuro de etidio (BrEt) fueron adquiridas con el sistema de documentación “GelDoc XR” de Bio-Rad. Estas imágenes fueron analizadas con el programa Quantity One, también de Bio-Rad.

Los alineamientos de secuencias se realizaron con el programa “ClustalW” [(Higgins *et al.*, 1994); <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>], que realiza alineamientos múltiples de secuencias de DNA o proteínas. Para el modelado de proteínas se utilizó el programa “Swiss-Model” [(Schwede *et al.*, 2003); <http://www.expasy.org>], que proporciona de manera automática un modelo de la estructura de la proteína basado en la homología con otras proteínas cuya estructura es conocida. Los análisis de comparación de secuencias para la búsqueda de homología se realizaron con los programas FASTA (Pearson and Lipman, 1988) y BLAST2 (Altschul *et al.*, 1990).

La confección de gráficas y el análisis estadístico de algunos datos se realizó con el programa “Sigmaplot”. El programa “Microcal Origin” se utilizó para el análisis de los datos procedentes de curvas desnaturalización térmica de RepB.

MÉTODOS

1. MÉTODOS GENERALES

1.1. CRECIMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LAS ESTIRPES BACTERIANAS

La temperatura de incubación para todas las estirpes bacterianas fue, en general, de 37 °C. Los cultivos de *E. coli* y *S. aureus* en medio líquido se crecieron en condiciones de aireación y fuerte agitación. En medio sólido el crecimiento de los cultivos de *E. coli* fue en superficie. Para los cultivos de *S. pneumoniae* se utilizaron condiciones microaerófilas de crecimiento. En medio líquido se utilizaron baños termostatzados sin agitación, y para el medio sólido, se cubrió la capa basal de medio de cultivo, que contiene las células de neumococo, con una capa de medio más ligera. En todos los casos, el crecimiento en medio líquido se siguió por turbidimetría, midiendo la absorbancia de los cultivos a las longitudes de onda de 600 nm para *E. coli* y *S. aureus*, y 650 nm para *S. pneumoniae*. Para ello, se empleó un espectrofotómetro Bausch & Lomb, modelo Spectronic 20D+. Todas las estirpes se conservaron a -80 °C, para lo cual se añadió a los cultivos un 10% de glicerol, y se incubó a 37 °C durante 10 min, seguidos de otros 10 min a 4 °C antes de la congelación.

1.2. PREPARACIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Las células competentes de *E.coli* TOP10 fueron suministradas por Invitrogen y la transformación se llevó a cabo siguiendo las indicaciones de la casa suministradora. En general, las células de *E. coli* se transformaron por electroporación siguiendo el método descrito por Dower (Dower *et al.*, 1988). Se utilizó el electroporador “Gene pulser” de Bio-Rad, con las siguientes condiciones para la electroporación: 25 µF, 2,5 kV/cm y 200 Ω.

Las células competentes de *S. pneumoniae* se prepararon siguiendo el método descrito por Lacks (Lacks, 1966). Los genes de resistencia a Cm y Em empleados en este trabajo son inducibles a concentraciones subinhibitorias del antibiótico (0,5 µg/ml).

1.3. PREPARACIONES DE DNA

1.3.1. Preparaciones de DNA plasmídico.

Las preparaciones de plásmido de cultivos de *E. coli* se realizaron por el método de extracción alcalina descrito por Birboim (Birboim and Doly, 1979). En el caso de *S. pneumoniae* se usó el mismo método incluyendo las modificaciones descritas por Stassi (Stassi *et al.*, 1981). También se usó para este propósito el kit de preparación de DNA plasmídico de “Genomed” en las escalas “Mini” y “Midi”. Para la

preparación de plásmidos puros de *S. pneumoniae* se utilizó el método descrito por del Solar (del Solar *et al.*, 1987).

1.3.2. Obtención de fragmentos de DNA.

Los fragmentos de DNA usados en esta tesis se describen en la Tabla 3. Algunos de los fragmentos se obtuvieron mediante digestión con enzimas de restricción, otros mediante anillamiento de oligos y, por último, por PCR (Innis *et al.*, 1990).

La digestión enzimática del DNA se realizó utilizando las soluciones y condiciones de reacción recomendadas por la casa suministradora. El anillamiento de oligos se realizó en tampón AN, que contiene 100 mM de NaCl, en un volumen final de 50 μ l en el que se añaden cantidades equimolares de ambas cadenas complementarias. La mezcla de anillamiento se incubó durante 10 min a 100 °C, y se dejó enfriar lentamente hasta llegar a unos 25 °C. El oligo ya anillado se conservó a -80 °C. Para la obtención de oligos bicatenarios con marca radiactiva en una sola cadena, se añadió, a la reacción de marcaje del extremo 5' (50 μ l), NaCl a una concentración final de 100 mM, y cuatro veces más del oligo complementario sin marcar. Se siguió el procedimiento de anillamiento descrito y, posteriormente, la mezcla de anillamiento fue fenolizada y cloroformizada, y el DNA precipitado con etanol. El precipitado de DNA, una vez seco, se disolvió en TE (10:1), obteniendo así oligos bicatenarios a una concentración de 10 nM y con una actividad específica de $1-3 \times 10^5$ cpm/pmol.

Las reacciones de PCR se realizaron en el tampón proporcionado por el suministrador de DNA polimerasa. Se usaron las siguientes condiciones: 20 pmoles de cada oligo, 200 μ M de cada uno de los dNTPs, y de 2 a 5 U de DNA polimerasa *Taq*, *Pfu* o *DNAZyme*, en un volumen final de 50 o 100 μ l. La cantidad de DNA molde que se añadió a la reacción dependió del tipo de DNA, 40 ng si se trataba de DNA plasmídico y 100 ng cuando era DNA cromosómico. Para la obtención por PCR de fragmentos de DNA marcados radiactivamente en una sola cadena, uno de los oligos se marcó radiactivamente con [32 P] en su extremo 5'. La actividad específica de los fragmentos así obtenidos fue de $1-3 \times 10^5$ cpm/pmol. También se obtuvieron por PCR fragmentos de DNA con marcaje radiactivo interno, añadiendo a la reacción de PCR [α - 32 P] dCTP.

En todos los casos descritos, la concentración de DNA bicatenario se calculó midiendo la absorbancia a 260 nm, estimando que una unidad de absorbancia corresponde a 50 μ g/ml de dsDNA, o mediante electroforesis en geles de agarosa o PAA, teñidos con BrEt, comparando la intensidad de las bandas de DNA con la de fragmentos de tamaño similar y concentración conocida. En concreto, se utilizó el marcador de DNA "HyperLadder" de Bioline.

1.4. MANIPULACIONES ENZIMÁTICAS DEL DNA

La mayoría de las modificaciones enzimáticas del DNA se realizaron en las condiciones de tampón y temperatura recomendadas por el fabricante. En algunos casos se siguieron las indicaciones descritas en (Sambrook *et al.*, 1989). La desactivación de las enzimas se realizó por calor siempre que estuviera indicado. En algunos casos, y dependiendo de la subsiguiente utilización del DNA modificado, fue necesario purificar las muestras mediante un proceso de extracción orgánica con una mezcla 1:1 (v/v) de fenol y cloroformo-isoamílico (24:1), seguida de una extracción con cloroformo-isoamílico (24:1), para finalmente recuperar el DNA por precipitación con acetato sódico 0.3 M, pH 7,0 y etanol 100%.

1.5. ELUCIÓN Y PURIFICACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS Y FRAGMENTOS DE DNA

Los fragmentos de DNA mayores de 500 pb se purificaron de geles preparativos de agarosa (0,8-1%) mediante extracción con fenol (Maniatis, 1982), o usando el kit de extracción de gel “QIAquick” de Quiagen. Los fragmentos de DNA menores de 500 pb se purificaron a partir de geles preparativos de PAA (5%) según el procedimiento descrito en (Maxam and Gilbert, 1980). Tras la elución del DNA en tampón E (42 °C, o/n), la solución se filtró a través de tubos “Spin-X” (COSTAR) para eliminar los restos de gel de acrilamida. Tras la purificación, el DNA bicatenario fue cuantificado según se indica en el apartado 1.3.2 de este Capítulo.

El proceso de síntesis de los oligos utilizados en esta tesis incluye una etapa final de purificación por HPLC. No obstante, algunos oligos (véase en la Tabla 4) fueron sometidos a una etapa posterior de purificación para eliminar de la mezcla las especies de tamaño inferior. La separación del oligo de longitud total del resto se realizó mediante electroforesis en geles verticales de PAA al 12% con 8 M de urea. Las muestras se mezclaron con un volumen de colorante de carga B XF(1X), se calentaron a 85 °C durante 5 min y se mantuvieron en mezcla de agua y hielo hasta el momento de la aplicación en el gel. La electroforesis se realizó en tampón TBE, a un voltaje constante de 1500 V, durante 120 min y a una temperatura alrededor de 50 °C. Concluida la electroforesis, se colocó el gel encima de una placa fluorescente de 10 x 10 cm (Fluor-coated TLC plate, Ambion), y se irradió con luz UV de onda corta. El DNA contenido en el gel se visualizó como una serie de bandas oscuras sobre el fondo fluorescente de la placa. Se recortó la porción del gel que contenía la banda de DNA correspondiente al oligo de longitud total, y se incubó a 42 °C, o/n, en tampón de elución EO (Tabla 5). Después de este tiempo, el DNA eluido se separó de los restos de acrilamida por filtración con los tubos Spin-X. Antes de precipitar el DNA con etanol, se redujo el volumen de DNA eluido unas cinco veces mediante sucesivas extracciones con 1-butanol (Maniatis, 1982). Tras la precipitación, el DNA se disolvió en tampón TE 10:1 y se aplicó a una columna de sephadex G-25 (“Microspin G-25”, Amersham Bioscience) para eliminar algunos compuestos, tales como el SDS, que

habían coprecipitado con el DNA. La cuantificación de los oligos purificados se realizó según se describe en el apartado 3.2 de Materiales.

1.6. SECUENCIACIÓN DEL DNA

Para la secuenciación del DNA en los ensayos de “footprinting” y de extensión del cebador, se siguió el método de terminación de cadena de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) o una variación del método de secuenciación química descrito en (Maxam and Gilbert, 1980). En el primer caso, se utilizó el kit de secuenciación de Amersham Biosciences, usando marcaje interno con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP o los cebadores marcados radiactivamente con ^{32}P en el extremo 5'. Como DNA molde se usaron aproximadamente 2 μg de DNA plasmídico desnaturalizado por álcali, con una relación cebador:molde de 10:1. En el segundo caso, se prepararon reacciones de secuencia G+A siguiendo el método descrito en (Belikov and Wieslander, 1995), y se usó DNA marcado en el extremo 5' (30.000-50.000 cpm) que fue modificado con ácido fórmico 0,05 M a 65 °C. Tras la modificación de las bases, el DNA fue digerido con piperidina 1M a 100 °C.

La comprobación de la secuencia de los diferentes DNAs obtenidos durante el desarrollo de esta tesis fue realizada por el Servicio de Secuenciación Automática del CIB.

1.7. ELECTROFORESIS DE DNA

1.7.1. *Electroforesis en geles de agarosa.*

Para la electroforesis del DNA en geles de agarosa se utilizaron geles horizontales con una concentración de agarosa variable entre 0,8 y 1,5%, dependiendo del tamaño del DNA a analizar. Para la aplicación en el gel, las muestras se disolvieron en los tampones de carga BXGE o SBE. La electroforesis se realizó en los tampones TAE o TBE, a voltaje constante y a temperatura ambiente. Condiciones tales como la duración de la electroforesis, el voltaje aplicado y la longitud del gel, dependieron de las características del DNA a analizar. La tinción del DNA se realizó sumergiendo los geles en una solución 0,5-1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de BrEt durante 30 min a t.a. En determinadas ocasiones era necesaria la tinción del DNA durante la electroforesis, para lo cual el BrEt se incluyó en el gel y el tampón. El DNA se visualizó con el sistema de documentación de geles “GelDocXR” (BIORAD) que consiste en un transiluminador de luz UV de onda corta (254 nm) con una cámara CCD acoplada para recoger las imágenes directamente en el ordenador.

1.7.2. *Electroforesis en geles de PAA.*

La electroforesis de fragmentos de DNA en geles nativos de PAA se realizó en geles verticales en tampón TBE. Se usaron geles de dos tamaños con dimensiones de

14,5 cm de ancho, 12 cm de largo y 1,5 mm de espesor para el grande, y 8,4 cm de ancho, 7,2 cm de largo y 0,75 mm de espesor para el pequeño. Los geles pequeños se prepararon usando el sistema Mini Protean-II (BIORAD). La concentración de PAA en los geles varió entre un 5 y un 10% dependiendo del tamaño y características de los DNAs que se pretendían analizar. En todos los casos, los geles se sometieron a pre-electroforesis durante al menos 30 min. En la mayoría de los casos se aplicó un voltaje de 100 V, aunque cuando fue necesario se aumentó el voltaje a 150 V. Antes de la aplicación en el gel, las muestras se disolvieron en tampón de carga BXGE, añadiendo SDS cuando fue necesario. Una vez terminada la electroforesis, los geles se tiñeron en tampón TBE con BrEt a una concentración de 0,5-1 µg/ml, y el DNA se visualizó por fluorescencia. Si la electroforesis se realizó con DNA marcado radiactivamente, que no iba a ser procesado posteriormente, los geles se incubaron 10 min en una solución de fijación con ácido acético al 10% y se deshidrataron mediante vacío a 80 °C. La visualización de las bandas se realizó por exposición autorradiográfica, usando pantallas amplificadoras cuando fue necesario, o mediante el sistema Phosphorimager, si se iba a cuantificar el DNA radiactivo.

1.7.3. Geles de secuenciación.

Los productos de las reacciones de secuenciación, de las reacciones de extensión del cebador, y de la digestión del DNA en los ensayos de “footprinting”, se sometieron a electroforesis en geles de PAA al 8%, con 7 M de urea, en tampón TBE. Los productos de reacción en los ensayos de actividad de la proteína RepB sobre oligos se analizaron en geles de PAA al 20%, con 8 M de urea, en tampón TBE.

En todos los casos, las dimensiones de los geles fueron 36 cm de ancho, 40 cm de largo y 0,35 mm de espesor. Las muestras fueron disueltas en tampón de carga BXF y se desnaturalizaron por calor durante 5 min a 85 °C, enfriándolas rápidamente en una mezcla de agua y hielo. Los geles fueron sometidos a electroforesis durante al menos 1 h a 1800 V, y durante la electroforesis se aplicó un voltaje constante de 1900-2000 V. Las bandas radiactivas fueron visualizadas por exposición autorradiográfica, o mediante el sistema Phosphorimager.

1.8. MARCAJE RADIATIVO DEL DNA

1.8.1. Marcaje de oligonucleótidos en 5'.

El marcaje de oligos en 5' se realizó siguiendo el método descrito en (Sambrook *et al.*, 1989) y las indicaciones de New England Biolabs sobre las condiciones de uso de la enzima T4 polinucleótido quinasa. Como isótopo radiactivo se empleó [γ -³²P] ATP, con una actividad específica de 3.000 Ci/mmol. La reacción de marcaje se realizó en el tampón proporcionado por el fabricante, con 80 pmoles de [γ -³²P] ATP, a 37 °C durante 30 min. La mezcla de reacción contenía entre 30 y 60 pmoles de oligo, dependiendo de la actividad específica requerida en el marcaje, y 10 U de enzima. Tras el marcaje, el nucleótido radiactivo no incorporado se eliminó por

cromatografía de filtración, empleando las columnas de shepadex G-25 “Microspin-G25” (Amersham Bioscience).

1.8.2. Marcaje de fragmentos de DNA por PCR.

Los fragmentos de DNA se marcaron radiactivamente en uno de los extremos 5', o internamente. La reacción de PCR se realizó según las condiciones descritas en el apartado 1.3.2 de este Capítulo, añadiendo, en cada caso, oligo marcado radiactivamente en el extremo 5', o bien nucleótido radiactivo (0,23 μ M de [α - 32 P] dCTP). Los fragmentos de DNA así obtenidos, se purificaron según se indica en el apartado 1.5 de este Capítulo.

1.9. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

Para la electroforesis de proteínas se prepararon geles discontinuos desnaturizantes de PAA (Laemmli, 1970) (acrilamida:bisacrilamida 40:1). El gel concentrador se preparó con PAA al 4% en 0,375 M de Tris-HCl pH 6,8 y 0,1% de SDS. El gel separador se preparó con una concentración de PAA que varió entre un 10 y un 16% en 0,375 M de Tris-HCl pH 8,8 y 0,1% de SDS. En ambos casos se usaron TEMED y PSA como catalizadores de la polimerización. Los geles se montaron en cubetas “Mini-Protean II y III” (BIORAD), con las dimensiones descritas anteriormente. Antes de la aplicación, las muestras se disolvieron en tampón de carga SLB y se desnaturalizaron calentando a 95 °C durante 3 min. La electroforesis se realizó en tampón TG (Tabla 5). Tras la aplicación de las muestras, se inició la electroforesis con un voltaje constante de 80 V hasta que las muestras atravesaron el gel concentrador. La electroforesis continuó con un voltaje constante de 180 V durante un tiempo que dependió del peso molecular de las proteínas a analizar. La tinción de los geles se realizó con una solución comercial de Azul de Coomassie Bio-safe (Bio-Rad) según las indicaciones del fabricante.

1.10. ENSAYOS DE “WESTERN-BLOT”

Las proteínas, una vez separadas por electroforesis en geles PAA/SDS, se electro-transfirieron a membranas de PVDF (del inglés “polyvinylidene difluoride”) utilizando tampón TG con un 20% de metanol. Para hidratar las membranas antes de la transferencia es necesario introducirlas en metanol puro hasta que aparecen traslúcidas, y a continuación sumergirlas en tampón de transferencia hasta equilibrarse. La transferencia se realizó durante 1 h a 350 mA y a 4 °C con un modulo de Bio-Rad. Una vez transferidas, las membranas se pueden conservar secas. Para volver a usarlas es necesario sumergirlas de nuevo en metanol puro y luego pasarlas al tampón elegido.

Para la incubación con el anticuerpo primario, las membranas transferidas se lavaron dos veces, 10 min cada vez, con TBST en agitación suave y a t.a. A continuación se incubaron durante 2-3 h (algunas veces incluso o/n) con la solución de

anticuerpo primario diluido (dilución 1/30.000 para el suero de conejo anti-RepB, y 1/5.000 para los anticuerpos monoclonales frente a MBP y His₆) en una solución de TBST con un 0,2% de caseína, y en las mismas condiciones de agitación y temperatura. Tras esta incubación, la membrana se lavó dos veces con TBST. La unión con el anticuerpo secundario se realizó incubando la membrana durante 2 h, en agitación suave y a t.a., con una dilución 1/30.000 de anti-IgG de conejo o ratón, conjugado con fosfatasa alcalina, en tampón TBST con un 2% de caseína. Tras dos lavados con TBST, la membrana estaba preparada para el revelado. El sistema de revelado es el “Immun-star AP” de Bio-Rad, con el que detectamos la emisión de luz por la acción de la fosfatasa alcalina sobre un sustrato quimioluminiscente. La detección de las bandas luminiscentes se realizó mediante exposición autorradiográfica con películas X-OMAT, o mediante un detector de quimioluminiscencia acoplado a una cámara CCD (LAS-3000, Fuji).

2. MÉTODOS ESPECÍFICOS

2.1. PURIFICACIÓN DE RepB

Se desarrolló un método de purificación de RepB para obtener la cantidad de proteína necesaria para los estudios bioquímicos, espectroscópicos y estructurales. Para sobreproducir RepB utilizamos el vector de expresión pGEMrepB1, con el gen *repB* bajo el control del promotor $\phi 10$ del fago T7, en la estirpe *E. coli* BL21(DE3) (Studier and Moffat, 1986). Para construir el vector pGEMrepB1 utilizamos el sistema de clonaje TA. Este sistema es uno de los más utilizados para el clonaje de fragmentos de PCR, y se basa en la actividad transferasa terminal de las polimerasas tipo *taq*, que añaden un residuo de adenina a los extremos 3' del dsDNA producto de la reacción de PCR. Este producto de PCR se puede introducir en un vector linealizado que contiene un residuo de timina en cada uno de sus extremos 3'. Debido a la complementariedad entre las bases protuberantes de los extremos, el vector y el producto de PCR pueden hibridar. En nuestro caso particular, utilizamos el vector pGEM-T (Promega) en el que introdujimos el fragmento repB, obtenido por amplificación de la región de pMV158 que contiene el gen *repB*, incluido su posible sitio de unión a los ribosomas.

La preparación de proteína pura obtenida finalmente procede de la inducción de 16 litros de cultivo, que son procesados en lotes de 4 litros. Cada lote se procesó de la siguiente manera: cuando el cultivo, crecido a 37 °C con fuerte agitación, alcanzó una DO₆₅₀ = 0,5, se indujo la hiperexpresión de *repB* por la adición de 1 mM de IPTG. Tras 30 min de incubación, en las mismas condiciones de agitación y temperatura, se añadió rifampicina (200 µg/ml) y se prolongó la incubación 90 min más. Se recogieron las células por centrifugación, y el sedimento celular se resuspendió en 40 ml de tampón H (Tabla 5) suplementado con 1 M de KCl. La suspensión celular se congeló y descongeló rápidamente para aumentar el rendimiento de la lisis. La lisis celular se llevó a cabo pasando la suspensión dos veces por una prensa French a una presión de 8,3 MPa. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación. Para eliminar los

ácidos nucleicos se añadió al sobrenadante polietilenimina (PEI) a una concentración de 0,2% (v/v). Se incubó con PEI durante 30 min a 4 °C y el precipitado se eliminó por centrifugación. Posteriormente, se añadió sulfato amónico a un 70% de saturación, y las proteínas que precipitaron se recogieron por centrifugación. Este sedimento proteico se disolvió en 40 ml de tampón H, suplementado con 1 M de KCl, y fue dializado o/n frente a tres litros de tampón H sin sal. Este paso facilita la purificación de RepB ya que, en condiciones de baja fuerza iónica, precipita selectivamente. El sedimento se recogió por centrifugación y se disolvió en 40 ml de tampón H suplementado con 300 mM de KCl. La muestra se aplicó, con un flujo de 70 ml/h, en una columna (2,5 cm de diámetro y 90 ml de volumen) de heparina-agarosa (“Affi-Gel” de Bio-Rad), equilibrada con el mismo tampón. Después de aplicar la muestra, se realizó un lavado (10 volúmenes de columna) con el tampón de equilibrado y las proteínas adsorbidas a la matriz se eluyeron mediante la aplicación de un gradiente lineal de 300 a 600 mM de KCl (400 ml). Se recogieron fracciones de 5 ml y su contenido se analizó mediante la precipitación de proteínas con TCA y electroforesis en geles de PAA/SDS. Las fracciones que contenían RepB se juntaron y fueron dializadas frente 3 l de tampón H suplementado con 300 mM de KCl. Como última etapa de purificación y concentración de la proteína, las fracciones seleccionadas en el anterior paso de purificación fueron aplicadas a la misma columna de heparina-agarosa equilibrada de la misma forma. Después del lavado con tampón de equilibrado (10 volúmenes de columna), se aplicó un segundo gradiente lineal de 0,3 a 1M de KCl (140 ml). Se recogieron fracciones de 2 ml y se analizaron igual que en el gradiente anterior. Se juntaron las fracciones centrales del pico de elución, aproximadamente a 425 mM de KCl, caracterizadas por su mayor pureza y concentración en RepB. En este momento, se estimó que la pureza en proteína RepB era mayor del 95%. La solución de RepB fue concentrada por filtración a través de filtros “Macrosep” y “Microsep” (Pall), con un tamaño medio de poro de 3,5 kDa, hasta que la concentración de la proteína fue de entre 10 a 20 mg/ml. La proteína RepB concentrada se repartió en alícuotas de 50 µl que fueron congeladas a -80 °C para su conservación. Para comprobar el estado de la proteína en cada preparación se comprobó su actividad de corte y cierre sobre DNA superenrollado. Para obtener una estimación de la fracción de proteína RepB activa en la purificación se realizó un ensayo de retardo en gel en condiciones de exceso molar del DNA del locus *bind* con respecto a la proteína, a partir del cual se calculó la concentración máxima de DNA unido. El porcentaje de proteína activa varió entre un 60 y un 80 % en las distintas purificaciones realizadas.

La concentración de RepB se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm (A_{280}). La expresión [1] permite conocer la concentración de proteína si se conoce su coeficiente de extinción molar a 280 nm (a_{280}) (Simonian, 2001):

$$\text{Concentración (mg/ml)} = A_{280} / a_{280} \times b \quad [1]$$

En esta ecuación, a_{280} tiene unidades de $\text{mg}^{-1} \times \text{ml} \times \text{cm}^{-1}$ y b es el paso óptico en cm. La determinación del coeficiente de extinción molar teórico de RepB se realizó

a partir del valor de a_{280} de los aminoácidos aromáticos Trp, Tyr y Phe presentes en la proteína, obteniéndose un valor de $1,0235 \text{ mg}^{-1} \times \text{ml} \times \text{cm}^{-1}$. Las medidas de A_{280} de RepB se realizaron en tampón H suplementado con 1 M de NaCl, en cubetas de cuarzo con un paso óptico de 1 cm, utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401.

Para determinar la presencia de ácidos nucleicos contaminantes se realizó un espectro en el UV de la preparación de proteína pura. Se puede obtener una estimación aproximada del contenido en ácidos nucleicos a partir de la relación de absorbancia a 280 y 260 nm. Esta estimación se basa en el hecho de que una solución de proteína tipo a una concentración de 1 mg/ml tiene una A_{280} de 1 (1,0235 en el caso de RepB), y presenta una relación A_{280}/A_{260} de aproximadamente 2,0. Una disminución del valor de la relación A_{280}/A_{260} desde 2,0 hasta 1,57 o 1,18 supone un 1% o 3%, respectivamente, de contaminación con ácidos nucleicos (Marshak *et al.*, 1996). Se realizaron espectros en el UV de la solución de proteína RepB pura desde 200 nm hasta 300 nm, en las mismas condiciones que para determinar su concentración, y el valor de la relación A_{280}/A_{260} estaba entre 1,8 y 2,0.

Para facilitar la lectura y comprensión de esta tesis, tanto en los sucesivos apartados de Métodos, como en el Capítulo de Resultados, la cantidad de RepB utilizada se indicará por su concentración molar referida al monómero de RepB (0.024 mg/ml son aproximadamente 1 μM).

2.2. PURIFICACIÓN DE PcrA

Para purificar PcrA decidimos utilizar el método de cromatografía de afinidad basado en la etiqueta de seis residuos His (His_6). Para ello utilizamos el sistema de expresión basado en el vector pQE30 (Quiagen), que permite realizar fusiones traduccionales con la etiqueta His_6 en el extremo N-terminal de la proteína. Para generar la construcción pQE30PA insertamos el fragmento HispcrASpn (Tabla 3), previamente digerido con la enzima KpnI, en el sitio de multiclonaje de pQE30. Este vector proporciona el codón de iniciación ATG y nos permitió introducir el resto del gen en la misma pauta de lectura que la secuencia que codifica la etiqueta His_6 .

Un litro de cultivo de la estirpe *E. coli* M15 con el vector pQE30PA, se creció a 37 °C, con fuerte agitación, hasta alcanzar una $\text{DO}_{650}=0,5$. En ese momento se indujo la hiperexpresión del gen *pcrA* por la adición de 1 mM de IPTG, y el cultivo se mantuvo en las mismas condiciones de agitación y temperatura durante 2 h más. Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 20 ml de tampón LIS. La suspensión celular se sometió a dos ciclos de congelación rápida en mezcla de hielo seco-etanol, y descongelación en baño de agua a 14 °C. Después se añadió lisozima a una concentración final de 4 mg/ml, y se incubó la suspensión a 4 °C durante 30 min. Como paso final de la lisis, se repitieron los dos ciclos de congelación y descongelación. El lisado celular se clarificó por centrifugación a 33.000 rpm durante 1 h a 4 °C. El sobrenadante, aproximadamente 10 ml, se mezcló con 1 ml de resina cargada con Ni^{2+} ("HIS-Select" de SIGMA), y la mezcla se incubó con agitación suave a 4 °C durante 1 h. Tras la incubación, la mezcla fue empaquetada en una columna y

se aplicaron 10 volúmenes de columna de tampón LIS como lavado. Para eluir His₆-PcrA, se aplicaron 5 ml de tampón ELU y se recogieron fracciones de 200 µl. Las fracciones fueron analizadas por electroforesis en geles de PAA/SDS, y la concentración de proteína se valoró mediante el reactivo BCA. La concentración de His₆-PcrA, en las fracciones del pico de elución, fue de 1-2 mg/ml, con una pureza alrededor del 90%.

2.3. ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE RepB

Con anterioridad a la realización de esta tesis se había caracterizado la actividad de RepB sobre el DNA (Moscoso, 1996) y (Moscoso *et al.*, 1995a), y se habían establecido las mejores condiciones para detectar su actividad tipo topoisomerasa I sobre DNA superenrollado o sobre oligos monocatenarios. A continuación, se describen los ensayos utilizados para determinar el grado de actividad de RepB tras su purificación, así como para caracterizar los intermedios de la proteína en el proceso de desnaturalización térmica.

2.3.1. Ensayos de actividad de RepB sobre DNA superenrollado.

Las reacciones se realizaron en 30 µl de tampón B, suplementado con 20 mM de MnCl₂ o de CoCl₂, con 500 ng de DNA plasmídico (pMV158 o pLS1) y diferentes concentraciones de RepB (desde 0.06 hasta 0.25 µM). Las mezclas de reacción se incubaron durante 30 min a 30, 37 o 60 °C. Las reacciones se pararon por la adición de 125 µg/ml de proteinasa K e incubación durante 10 min a t.a. Las muestras fueron analizadas por electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón TBE, en presencia de 0,5 µg/ml de BrEt, y con un voltaje constante de 2,7 V/cm. Los productos de la actividad de RepB se visualizaron bajo la luz UV tal y como se describe en el apartado 1.7.1 de este Capítulo.

2.3.2. Ensayos de actividad sobre oligonucleótidos monocatenarios.

Para estos ensayos se utilizó como sustrato el oligo 23-mer pfx23 marcado radiactivamente en su extremo 5' con [³²P]. Las reacciones se realizaron en 30 µl de tampón B, suplementado con diferentes concentraciones de MnCl₂ o CoCl₂, con 0,9 pmoles de oligo y varias concentraciones de proteína, a relaciones molares proteína:oligo desde 0,5:1 hasta 9:1. Las reacciones transcurrieron durante 30 min a 30, 37 o 60 °C, y se pararon por la adición de 200 mM de EDTA y 300 µg/ml de proteinasa K. A continuación, las muestras fueron precipitadas con etanol, usando tRNA como coprecipitador, y se disolvieron directamente en tampón de carga BXF para ser analizadas en un gel de secuencia de PAA al 20% y 8 M de urea. Tras la electroforesis, las bandas fueron visualizadas y cuantificadas mediante el sistema Phosphorimager.

2.4. ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE PcrA

2.4.1. Actividad ATPasa.

La actividad ATPasa de His₆-PcrA se midió por la hidrólisis de [α -³²P] dATP o ATP. Las reacciones de hidrólisis (20 μ l) se realizaron en tampón TEKEM 1X (Tabla 5), con 1 μ Ci de [α -³²P] dATP o ATP y una concentración de PcrA que variaba entre 0,6 y 6 nM. En los casos indicados, las mezclas de reacción también contenían 100 ng de oligonucleótido monocatenario de 55 nt de longitud. Las mezclas de reacción se incubaron a 37 °C durante 1 h. Para parar la reacción, se añadió EDTA a una concentración final de 83 mM. El análisis de los productos de la reacción se realizó mediante cromatografía en capa fina (TLC) de alícuotas de 5 μ l en láminas de PEI, usando como tampón 0,5 M de KH₂PO₄ (pH 3,5). Para su visualización, las láminas de PEI se secaron y se sometieron a autorradiografía.

2.4.2. Actividad helicasa.

Los fragmentos de DNA A, B, C y D (Tabla 3) se utilizaron como sustrato para detectar y caracterizar la actividad helicasa de His₆-PcrA. La preparación de estos fragmentos de DNA, en los que una de las cadenas se marcó radiactivamente en su extremo 5', se realizó según se describe en el apartado 1.3.2. Las reacciones de actividad helicasa se realizaron en tampón HEL (Tabla 5). Diferentes cantidades de PcrA, cuya concentración variaba entre 5 y 25 nM, se incubaron con 4 nM de DNA sustrato durante 30 min a 37 °C. La reacción se paró por la adición de tampón de carga BXGE con SDS al 0,2%, y los productos se analizaron por electroforesis en geles nativos de PAA al 10%. Las bandas de DNA radiactivo se visualizaron por autorradiografía.

2.4.3. Actividad de desenrollamiento del DNA plasmídico in vitro.

Con estos ensayos se determinó la actividad de PcrA para iniciar el desenrollamiento del DNA de pT181. En las reacciones se incubaron 0,5 μ g de DNA de pT181cop608 en 20 μ l de tampón TEKEM 1X, con 5 mM de ATP, en ausencia o en presencia de RepC (200 ng) y en ausencia o en presencia de His₆-PcrA_{Sau} o His₆-PcrA_{Spn} (de 10 a 50 ng de cada una) durante 30 min a 42 °C. Los productos de la reacción se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón TBE con 0,5 μ g/ml de BrEt.

2.5. ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES PROTEÍNA-DNA

2.5.1. Formación de los complejos RepB-DNA.

Las reacciones de unión se realizaron en 5-10 μ l de tampón B, pudiéndose escalar hasta un volumen de 50 μ l. En las reacciones de unión con DNA marcado radiactivamente se utilizó una concentración de DNA de 0,5 nM. Los complejos se formaron al mezclar proteína RepB purificada, a las concentraciones indicadas en cada caso, con diferentes fragmentos de DNA en tampón B. Las mezclas de reacción fueron incubadas durante 30 min a 25 °C. En estos ensayos, la solución concentrada de proteína RepB se diluyó en tampón H sin EG y suplementado con 450 mM de KCl. En la unión con DNA marcado radiactivamente fue necesario añadir 10 ng/ μ l de poly(dI-dC) como competidor inespecífico. Para separar el DNA libre y unido a RepB, las muestras se sometieron a electroforesis en geles nativos de PAA al 5% en tampón TBE, a 10 V/cm. Las bandas fueron visualizadas tal y como se indica en el apartado 1.7.2.

2.5.2. Formación de los complejos PcrA-DNA.

Para estudiar la formación de los complejos His₆-PcrA-DNA se utilizaron como sustrato los fragmentos de DNA A, B, C y D (Tabla 3), con uno de los extremos 5' marcado radiactivamente. Las reacciones de unión se realizaron en 10 μ l de tampón HEL sin ATP, en presencia de 10 ng/ μ l de poly(dI-dC). Los complejos se formaron al incubar distintas cantidades de proteína PcrA (desde 2 hasta 240 nM) con 4 nM de DNA durante 20 min a t. a. La ausencia de ATP en la reacción permitió distinguir la capacidad de unión a DNA de la actividad helicasa de His₆-PcrA. Los complejos proteína-DNA fueron resueltos por electroforesis en geles nativos de PAA al 6%, a 10 V/cm en tampón TBE. Después de secar los geles, las bandas de DNA fueron visualizadas por autorradiografía.

2.5.3. Análisis de la cooperatividad en la unión de RepB al DNA.

Para valorar el potencial del efecto cooperativo de los sucesivos eventos de unión de RepB a los fragmentos de DNA que contenían el locus *nic*, el locus *bind* o el *dso* entero, usamos los resultados obtenidos en los experimentos de retardo en gel (Figura 14, Capítulo 1 de Resultados) según el procedimiento descrito en (Senear and Brenowitz, 1991). Usamos un sistema modelo para dos o tres sitios de unión, según observáramos dos o tres complejos RepB-DNA. A partir de la cuantificación de los geles de retardo obtuvimos las fracciones de DNA con 0, 1 o 2 sitios ocupados por RepB en un sistema de dos sitios, que corresponderían al DNA libre y a los complejos C1 y C2, respectivamente. En la unión de RepB al fragmento que contienen el *dso* entero se observaron tres complejos (C1, C2 y C3), que corresponderían al DNA con 1, 2 o 3 sitios ocupados por RepB en un sistema de tres sitios.

Tabla 6

A. Dos sitios (caso general)				
Especie	Configuraciones de unión		Contribuciones de energía libre	Energía libre total
	Sitio 1	Sitio 2		
1			Estado de referencia	ΔG_{s1}
2	L		ΔG_1	ΔG_{s2}
3		L	ΔG_2	ΔG_{s3}
4	L	\leftrightarrow L	$\Delta G_1 + \Delta G_2 + \Delta G_{12}$	ΔG_{s4}
B. Tres sitios (caso específico)				
Especie	Configuraciones de unión			Energía libre total
	Sitio 1	Sitio 2	Sitio 3	
1				Estado de referencia
2	L			ΔG_1
3		L		ΔG_2
4			L	ΔG_3
5	L	\leftrightarrow L		$\Delta G_1 + \Delta G_2 + \Delta G_{12}$
6		L	\leftrightarrow L	$\Delta G_2 + \Delta G_3 + \Delta G_{23}$
7	L	\leftrightarrow	L	$\Delta G_1 + \Delta G_3 + \Delta G_{13}$
8	L	\leftrightarrow L	L	$\Delta G_1 + \Delta G_2 + \Delta G_3 + \Delta G_{12}$
9	L		L	$\Delta G_1 + \Delta G_3 + \Delta G_{13}$
10	L	\longleftrightarrow	L	$\Delta G_1 + \Delta G_2 + \Delta G_3 + \Delta G_{13}$

En la Tabla 6 se muestra el modelo para un sistema compuesto por un DNA, con dos o tres sitios de unión que interactúan, y un solo ligando proteico. La probabilidad relativa de cada una de las configuraciones viene dada por:

$$f_s = \frac{e^{-\Delta G_s/RT} L_j}{\sum_{sj} e^{-\Delta G_s/RT} L_j}$$

donde ΔG_s es la suma de las contribuciones de energía libre para la configuración s (Tabla 6), R es la constante de los gases, T es la temperatura absoluta, L es la concentración de proteína libre, y j es el número de ligandos unidos en la configuración s . Las ecuaciones para θ_i , es decir, la fracción de moléculas de DNA con exactamente i ligandos unidos, se obtienen de sumar las probabilidades relativas de las configuraciones apropiadas. Para un sistema de dos sitios (Tabla 6 A):

$$\theta_0 = f_1$$

$$\theta_1 = f_2 + f_3$$

$$\theta_2 = f_4$$

estas ecuaciones se pueden simplificar con la sustitución $k = e^{-\Delta G_s/RT}$, obteniendo:

$$\theta_0 = 1/Z$$

$$\theta_1 = (k_1 + k_2) L/Z$$

$$\theta_2 = (k_1 k_2 k_{12}) L^2/Z$$

donde Z es el polinomio de unión, que es igual a $1 + (k_1 + k_2) L + (k_1 k_2 k_{12}) L^2$. k_1 y k_2 son las constantes de asociación microscópicas en el equilibrio para la unión

intrínseca a los sitios 1 y 2. k_{12} es la constante que describe las interacciones cooperativas cuando ambos sitios están unidos a la proteína. La valoración de la cooperatividad, y su posible implicación en mecanismos reguladores, se basa en el término k_{12} , o en su correspondiente ΔG . Sin embargo, puesto que las constantes microscópicas en el equilibrio, k_1 , k_2 y k_{12} aparecen sólo en dos combinaciones, pueden ser reemplazadas por dos constantes macroscópicas definidas por $K_1 = k_1 + k_2$, y $K_2 = k_1 k_2 k_{12}$. Las constantes K_1 y K_2 son los únicos parámetros que podemos calcular de un solo experimento de retardo en gel.

Esta aproximación, para la obtención de las ecuaciones de unión, es extensible a un sistema de tres o más sitios. Sin embargo, en estos sistemas existen múltiples configuraciones, con dos o más sitios unidos, que generan múltiples perfiles de interacción cooperativa. En el modelo expuesto en la Tabla 6 B se muestran las características de un sistema de tres sitios para el que sólo se consideran interacciones cooperativas entre pares, que son las que se piensan que ocurren inicialmente en la naturaleza. Las ecuaciones para las fracciones de moléculas de DNA con tres sitios unidos son:

$$\begin{aligned}\theta_0 &= 1/Z \\ \theta_1 &= (k_1 + k_2 + k_3) L/Z = K_1 L/Z \\ \theta_2 &= (k_1 k_2 k_{12} + k_1 k_3 k_{13} + k_2 k_3 k_{23}) L^2/Z = K_2 L^2/Z \\ \theta_3 &= (k_1 k_2 k_3 (k_{12} + k_{13} + k_{23})) L^3/Z = K_3 L^3/Z\end{aligned}$$

donde $Z = 1 + K_1 L + K_2 L^2 + K_3 L^3$.

Las interacciones cooperativas se pueden inferir de la comparación de las constantes macroscópicas en el equilibrio. En un sistema de dos sitios, se puede inferir cooperatividad siempre que $K_2 > K_1^2/4$. En un sistema de tres sitios, el segundo y tercer evento de unión son cooperativos si $K_2 > K_1^2/3$, y si $K_3 > K_2 K_1/3$, respectivamente.

2.5.4. Análisis de la estabilidad de los complejos RepB-DNA.

La estabilidad de los complejos RepB-DNA se analizó mediante ensayos de cinética de disociación en los que la mezcla de proteína RepB y DNA marcado radiactivamente en su extremo 5' (fragmentos con el locus *nic* o *bind*), se equilibró en condiciones en las que la fracción de C1 era aproximadamente 0,8 y no se observaba C2. La disociación se inició al añadir en el momento $t=0$ un exceso molar de 300 veces del mismo DNA del locus *nic* o *bind* sin marcaje radiactivo. A continuación se recogieron varias alícuotas, a distintos intervalos de tiempo, que se aplicaron en un gel nativo de PAA al 5% en el transcurso de la electroforesis. Para comprobar las condiciones de competición, se añadió RepB a la mezcla de fragmentos de DNA específico marcados y sin marcar (relación molar 1:300), y se incubaron en las mismas condiciones. De esta reacción de control pudimos calcular el porcentaje de DNA marcado unido a la proteína, considerado como "fondo" (máximo un 5%), que se sustrajo del valor del DNA que permanece como complejo en las muestras del estudio cinético. Las bandas de DNA radiactivo fueron cuantificadas directamente mediante

Phosphorimager. Los datos fueron analizados de acuerdo con la siguiente ecuación para una reacción de primer orden:

$$\ln ([C1]/[C1]_0) = -k_d t \quad [2]$$

donde [C1] representa la concentración de complejo RepB-*nic/bind* en el tiempo t y $[C1]_0$ es su valor en el momento $t=0$. Los valores de la constante de la velocidad de disociación o k_d y de la vida media del complejo C1 (dada por $\ln 2/k_d$) fueron estimados por el análisis por mínimos cuadrados de los datos.

2.5.5. Cálculo de la constante de afinidad relativa de RepB por distintos DNAs.

La afinidad relativa de RepB por distintos DNAs se determinó mediante ensayos competitivos de retardo en gel. Se utilizaron varios fragmentos de DNA de diferente tamaño (a una concentración de 0,5 nM) que fueron incubados con cantidades crecientes de RepB (desde 0,3 hasta 1 μ M). El DNA FAD, marcado radiactivamente mediante PCR con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$, fue digerido sucesivamente con los enzimas de restricción Hgal y Fnu4HI, de manera que se obtuvieron tres fragmentos de 153, 119 y 75 pb, que contienen, respectivamente, el locus *bind*, el locus *nic* y un DNA de secuencia inespecífica. Los tres fragmentos fueron separados y purificados en geles nativos de PAA al 5%. La concentración de los tres DNAs fue calculada, en este caso, por la radiactividad incorporada en cada fragmento, corregida para su contenido en bases guanina (G) y citosina (C). Para identificar correctamente los diferentes complejos RepB-DNA, se realizaron reacciones de unión de RepB con cada uno de los tres fragmentos por separado y se analizaron en el mismo gel. Las bandas de DNA radiactivo fueron detectadas y cuantificadas mediante Phosphorimager. La afinidad relativa de RepB por un par de DNAs D_1 y D_2 fue determinada según la siguiente ecuación (Man and Stormo, 2001):

$$K_{rel}(D_1/D_2) = [P\text{-}D_1][D_2] / [P\text{-}D_2][D_1] \quad [3]$$

donde K_{rel} es la constante de unión relativa en el equilibrio de la proteína por D_1 respecto a D_2 . Los términos $[P\text{-}D_1]$ y $[D_1]$ son, respectivamente, la concentración de DNA D_1 unido y libre, mientras que $[P\text{-}D_2]$ y $[D_2]$ son la concentración de DNA D_2 unido y libre.

2.5.6. Análisis de la curvatura del DNA.

Para analizar la curvatura del DNA se construyeron derivados del plásmido pBEND2 (Kim *et al.*, 1989), mediante el clonaje de fragmentos de DNA que contenían el locus *nic* o el locus *bind* (generados por PCR con la DNA polimerasa *Pfu*) en el sitio Sall del vector. Las construcciones (pBEND2*nic* y pBEND2*bind*, respectivamente) fueron validadas mediante la secuenciación del DNA clonado. Los fragmentos de DNA

permutados fueron generados por digestión de cada una de las construcciones con las enzimas de restricción BglII, XhoI, EcoRV, PvuII, SmaI, StuI, SspI, RsaI y BamHI. Todos los fragmentos fueron purificados a partir de geles de PAA al 5%.

Para calcular el ángulo de la curvatura del DNA, tanto intrínseca como inducida por la proteína, se realizaron ensayos de retardo en gel en los que los fragmentos de DNA permutados (10 nM) se incubaron con RepB a una relación molar proteína:DNA de 43:1. Las muestras se aplicaron en geles nativos de PAA al 6% como se describe en (Thompson and Landy, 1988). Después de la electroforesis, los geles se tiñeron con BrEt y las bandas se visualizaron como se indica en el apartado 1.7.2. Los ángulos de curvatura se determinaron por interpolación de los datos de movilidad relativa con la curva estándar, para un gel de PAA al 6%, construida por Thompson and Landy (1988) (Thompson and Landy, 1988).

2.5.7. Ensayos de “footprinting”.

Esta técnica se basa en la medida de la accesibilidad al DNA que presentan un conjunto de agentes. Los agentes pueden ser sustancias químicas o enzimas, que son capaces de cortar el esqueleto del DNA o de modificar sus bases. El sustrato de estas reacciones es un fragmento de DNA lineal, aunque también es posible utilizar DNA plasmídico, que contienen la secuencia específica de unión de una proteína. Las regiones del DNA contactadas por la proteína aparecen, por lo general, protegidas frente a la acción de este tipo de agentes, en comparación con el perfil del DNA sin proteína.

Los perfiles de “footprinting” van a depender del agente que utilizemos. El radical hidroxilo ($\text{OH}\bullet$) presenta una serie de características, como independencia de secuencia, alta resolución (1 pb), reacción de corte compatible con la mayoría de tampones, que aconsejan su uso frente a otros agentes. Tanto el dimetil sulfato (DMS) como el permanganato potásico (KMnO_4) son dos agentes químicos con un uso muy extendido para analizar las interacciones proteína-DNA. El DMS metila preferentemente el nitrógeno-7 de la guanina y el nitrógeno-3 de la adenina (A), de manera que la reactividad con los residuos G sucede por el surco mayor y con los residuos A por el surco menor (Shaw and Stewart, 1994). La alteración de la reactividad de los residuos frente al DMS por la unión de una proteína puede producir tanto la reducción de la metilación como el aumento de la misma. El KMnO_4 se utiliza para estudiar cambios de conformación del DNA. Este agente oxida con preferencia las bases pirimidínicas, siendo más reactivo con las timinas que con las citosinas, en regiones del DNA con una alteración del apareamiento o del apilamiento de las bases (Craig *et al.*, 1998).

En resumen, la combinación de la información de alta resolución de los contactos de la proteína con el esqueleto azúcar-fosfato del DNA, proporcionada por el “footprinting” con $\text{OH}\bullet$, con la que proporcionan los agentes que modifican directamente las bases del DNA, como el DMS o el KMnO_4 , es útil para construir un mapa preciso de las interacciones de una proteína con su DNA específico.

2.5.7.1. Ensayos de “footprinting” sobre DNA lineal.

Estos ensayos se realizaron para determinar los contactos que se establecen entre RepB y varios fragmentos de dsDNA lineal que contienen las distintas regiones del *dso*. Los fragmentos de DNA utilizados (*dso* entero, locus *nic* y locus *bind*) se marcaron radiactivamente en uno de sus extremos 5'. En las reacciones de unión se mezclaron 0,5 nM de fragmento de DNA, 200 nM de proteína RepB y 10 µg/ml de poly(dI-dC) en 50 µl de tampón B, durante 30 min a 25 °C. El tratamiento con OH• se inició con la adición de 9 µl de la mezcla reactiva [Fe(II)-EDTA, H₂O₂ y ascorbato sódico] preparada como se describe en (del Solar *et al.*, 1990). Las reacciones se pararon, tras 5 min de incubación a 25 °C, con 15 µl de una solución 0,1 mM de tiourea y 20 mM de EDTA. A continuación, el DNA libre se separó del unido a RepB mediante electroforesis en geles nativos de PAA al 5%. Las bandas de DNA correspondientes se purificaron y analizaron en geles de secuencia de PAA al 8% y 7 M de urea. Para identificar las regiones protegidas se incluyeron en los geles las reacciones de secuenciación química del mismo fragmento.

Los ensayos de “footprinting” con DMS se realizaron como se describe en (Papavassiliou, 1993; Sasse-Dwight and Gralla, 1991). Las reacciones de unión se prepararon como se describe en el párrafo anterior, y se sometieron a electroforesis en geles nativos de PAA al 5%. En estos ensayos, las moléculas de DNA unidas a RepB o libres se modificaron *in situ* sumergiendo los geles en una solución 0,2% (v/v) de DMS. Tras 5 min de incubación, la reacción de metilación se paró con una solución 0,5 M de β-ME. A continuación los DNAs se eluyeron de la matriz del gel mediante la incubación o/n a 42 °C en tampón EO, de la porción del gel correspondiente a las bandas de DNA radiactivo. El DNA eluido se recuperará por precipitación con etanol tras dos extracciones orgánicas consecutivas. Los DNAs sedimentados se disolvieron en agua (Milli-Q) para ser digeridos con 10 M de piperidina a 100 °C. Finalmente, los DNAs digeridos se analizaron en geles de secuencia como se indica en el párrafo anterior.

2.5.7.2. Ensayos de “footprinting” sobre DNA superenrollado.

Los ensayos de “footprinting” con DMS o KMnO₄ se realizaron esencialmente como se describe en (Sasse-Dwight and Gralla, 1991). En las reacciones de unión se mezclaron 2 µg de DNA plasmídico (pMV158 o pCGA7; 12 y 21 nM, respectivamente) con distintas cantidades de RepB (en el rango de 0,18 a 4,8 µM) en 45 µl de tampón B. La reacción de metilación con DMS se inició después de 25 min de unión a 25 °C mediante la adición de 5 µl de la mezcla reactiva (300 mM de DMS en 10 mM de Tris-HCl, pH 8,0), que supone una concentración final de 30 mM de DMS. La reacción de metilación transcurrió durante 5 min a 25 °C, y se detuvo al añadir 100 µl de solución STOP (1 M β-ME, 3 M de acetato amónico y 20 mM de EDTA). El DMS se eliminó mediante la precipitación del DNA con etanol. Los nucleótidos metilados se identificaron mediante la técnica de “extensión del cebador” con la DNA polimerasa del fago T7 y el oligo *dso1* marcado en su extremo 5' con [³²P]. Para ello, unos 0,3 pmoles

de DNA plasmídico, desnaturalizado con 0,2 M de NaOH, fueron anillados con 1,5 pmoles de oligo. La mezcla se incubó durante 10 min a 37 °C, en un volumen de 10 µl de tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, con 1,5 U de DNA polimerasa de T7, 45 mM de NaCl, 10 mM de MgCl₂ y 16 mM de DTT. Las reacciones se pararon con 7 µl de tampón de carga BXF (1X), y las muestras se analizaron en geles de secuencia con PAA al 8% y 7 M de urea.

Las reacciones de oxidación con KMnO₄ se iniciaron por la adición de 5 µl de una solución 100 mM de KMnO₄ (concentración final 10 mM) a las mezclas de unión. Las reacciones se pararon con 50 µl de solución STOP (3M de β-ME, 40 mM de EDTA, 0,6 M de acetato sódico, pH 4,8), y el DNA se recuperó por precipitación con etanol. Los nucleótidos modificados se identificaron como se describe en el párrafo anterior.

2.6. ANÁLISIS Y DETECCIÓN DE MOLÉCULAS DE RNA

El análisis de las moléculas de RNA sintetizadas a partir del promotor Pa se realizó por RT-PCR y extensión del cebador. Las reacciones de RT-PCR se realizaron usando el sistema “ThermoScript™ RT-PCR” de Invitrogen. Este sistema está diseñado para la detección sensible y reproducible de moléculas de RNA en un proceso que consta de dos pasos. El primer paso consiste en la síntesis de cDNA con la transcriptasa reversa “ThermoScript™ RT”, usando cebadores específicos de los genes cuya expresión se quiere analizar. Esta transcriptasa reversa es de origen aviar, presenta una actividad RNasa H reducida y mayor estabilidad térmica. Estas características nos permiten obtener transcritos de cDNA de longitud total a partir de RNAs de un tamaño que varía entre 100 y 1.2000 nt, según las indicaciones del fabricante. En el segundo paso, se realiza PCR del cDNA sintetizado usando cebadores específicos.

Las reacciones de síntesis de cDNA se realizaron en el tampón proporcionado por el kit, con 400 ng de RNA procedente de la estirpe *S. pneumoniae* T4, 1 µM del cebador específico y 15 U de la transcriptasa reversa. Se comprobó por PCR la ausencia de DNA contaminante en la preparación de RNA molde. Antes de la adición del enzima, el RNA y el cebador fueron desnaturalizados durante 5 min a 65 °C. La reacción de síntesis de cDNA se llevó a cabo a una temperatura de 50 °C durante 60 min. La reacción se terminó incubando 5 min a 85 °C. Para evitar que el RNA molde de la preparación pudiera interferir en el siguiente paso de PCR, se añadió RNasa H y se incubó a 37 °C durante 20 min. El siguiente paso de PCR se realizó esencialmente como está descrito en el apartado 1.3.2, añadiendo como DNA molde 1/10 de la reacción de síntesis de cDNA. El producto de la reacción de PCR se analizó en geles de agarosa teñidos con BrEt.

La reacción de extensión del cebador se realizó según se describe en (del Solar *et al.*, 1995). La reacción se realizó en el tampón proporcionado por Promega para la transcriptasa reversa AMV. En la mezcla de reacción se usaron 15 µg de RNA molde procedente de la estirpe T4 de *S. pneumoniae* o de la estirpe TOP10 de *E. coli* con el plásmido pCR2.1PN, 1 pmol del cebador específico (oligonucleótido pEXT,

Tabla 4) y 26 U de enzima. La mezcla se incubó a 43 °C durante al menos 1 h. Como isótopo radiactivo se utilizó [α -³²P] dATP, con una actividad específica de 3.000 Ci/mmol. Las muestras fueron analizadas en geles de secuencia como se indica en el apartado 1.7.3 de este Capítulo. Para poder estimar la longitud del oligo extendido, se utilizaron como control reacciones de secuencia, por el método de Sanger, utilizando el mismo oligonucleótido como cebador. Las bandas de DNA radiactivo se visualizaron por autorradiografía.

2.7. ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS DE RepB

2.7.1. Determinación del espectro de dicroísmo circular de RepB.

El dicroísmo circular (DC) se ha convertido en la técnica estándar para medir la actividad óptica de las proteínas. La luz polarizada en un plano es la suma de dos componentes de luz polarizada circularmente a derechas e izquierdas. Una muestra con actividad óptica absorberá cada uno de estos dos componentes en distinta cantidad, de manera que el vector resultante describirá una elipse, donde la relación entre el eje mayor y el menor es una medida de la elipticidad. Los cromóforos de las proteínas no son quirales y no presentan actividad óptica, por lo que su señal de DC está asociada a la asimetría óptica de su entrono. La señal de DC se observa en la misma región espectral donde se encuentran las bandas de absorción de un determinado compuesto. En proteínas, el Trp, Tyr y Phe son los principales cromóforos en el UV cercano (240-320 nm), mientras que el enlace peptídico es el principal cromóforo en el UV lejano o región amida. Las bandas de DC en la región amida contienen información sobre los enlaces peptídicos y la estructura secundaria de la proteína, y se usan con frecuencia para seguir cambios en la estructura secundaria en el transcurso de transiciones estructurales. La contribución más importante en el espectro de DC de una proteína en la región amida la realiza la hélice α , mientras que la contribución de las otras estructuras secundarias está peor definida.

El espectro de dicroísmo de RepB fue adquirido con un espectropolarímetro JASCO J-810 equipado con un controlador de temperatura tipo “peltier”. La proteína purificada RepB fue equilibrada por diálisis en el tampón CD, y diluida en este mismo tampón hasta una concentración de 30 u 80 μ M para la adquisición del espectro en el UV lejano y cercano, respectivamente. El espectro en el UV lejano fue adquirido en cubetas de cuarzo con un paso óptico de 0,1 o 1 mm, a 20 °C y en un rango de longitud de onda de 190 a 260 nm. El espectro fue el resultado de cuatro acumulaciones, a una velocidad de barrido de 20 nm/min, un ancho de banda de 1 nm y una respuesta de 4 segundos. El espectro en el UV cercano fue adquirido en las mismas condiciones, en cubetas de 1 cm de paso óptico y un rango de longitud de onda de 250 a 300 nm.

En ambos casos, los valores de elipticidad a cada longitud de onda se expresaron como elipticidad molar por residuo, tras la sustracción del espectro del tampón, según la expresión:

$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \Theta \times 100 \times M_r / c \times l \times n \quad [4]$$

donde Θ es la elipticidad medida en grados, c es la concentración de la proteína en mg/ml, l es el paso óptico en cm, M_r es el peso molecular de la proteína y n es el número de residuos de la proteína. Las unidades de $[\Theta]_{\text{MRW}}$ son grados $\times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$. La elipticidad molar por residuo calculada se representó frente a la longitud de onda.

Para obtener información estructural, los datos de DC en el UV lejano se analizaron con cuatro programas diferentes: CONTIN, que implementa el algoritmo de regresión “ridge” de Provencher y Glockner (Provencher and Glockner, 1981); SELCON, que incorpora un método auto-consistente junto con un algoritmo de descomposición de valores únicos para asignar estructuras secundarias de proteínas (Sreerama and Woody, 2000); CDNN (Böhm *et al.*, 1992) y K2D (Andrade *et al.*, 1993), que son métodos para el análisis de espectros de DC mediante el uso de redes neurales.

2.7.2. Análisis de la estabilidad térmica de RepB por dicroísmo circular.

Se analizaron los cambios inducidos en la estructura de RepB por el incremento de temperatura desde 20 a 95 °C a tres tasas diferentes: 14°, 45° y 60° por h. Los cambios en la elipticidad de RepB a 218 se registraron en cubetas de 0,1 cm de paso óptico, mientras que los cambios a 284 nm se registraron en cubetas de 1 cm de paso óptico. La concentración de proteína utilizada en estos experimentos es la misma que la indicada en el apartado anterior. Además, se recogieron espectros de DC de la proteína, tanto en el UV próximo como en el lejano, en el rango de temperatura de 20 a 95 °C coincidiendo con incrementos de 5°. En todos los casos, la temperatura se equilibró durante 1 min antes de adquirir el espectro.

2.7.3. Determinación del espectro de fluorescencia de RepB.

El espectro de fluorescencia de RepB fue adquirido en un espectrofluorímetro modular Fluorolog. La proteína purificada RepB fue equilibrada por diálisis en el tampón CD, y diluida en este mismo tampón a distintas concentraciones entre 0,2 y 10 μM (4,8 $\mu\text{g/ml}$ y 0,24 mg/ml, respectivamente). Los espectros de emisión de fluorescencia se adquirieron a dos longitudes de onda de excitación diferentes: 282 y 295 nm, en cubetas de 1 cm de paso óptico, a una temperatura de 25 °C, y en un rango de longitud de onda de 290 a 450 nm. Como control se utilizó una solución de triptofanamida a una concentración de 10 μM .

2.8. DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR DE RepB Y DE SUS PROPIEDADES HIDRODINÁMICAS POR ULTRACENTRIFUGACIÓN ANALÍTICA

Este tipo de ensayos fueron realizados por el Servicio de Ultracentrifugación Analítica del CIB.

2.8.1 Equilibrio de sedimentación.

Los experimentos de equilibrio de sedimentación se realizaron en una ultracentrífuga analítica Optima XL-A (Beckman-Coulter), equipada con una óptica para la región UV y visible, usando un rotor An60Ti, con celdas de centrífuga de seis sectores, paso óptico de 12 mm y la parte interna compuesta por una resina epoxy. Las condiciones experimentales se establecieron para un rango de concentración de proteína RepB entre 1 y 40 μ M. Las sucesivas diluciones de proteína se realizaron en tampón UA (basado en el tampón H con 0,1 mM de DTT y 450 mM de KCl), a partir de una solución concentrada de RepB equilibrada por diálisis en el mismo tampón UA.

Las muestras fueron centrifugadas a dos velocidades sucesivas (8.000 y 10.000 rpm), a una temperatura de 20 °C, y las lecturas de absorbancia se realizaron en intervalos de 3 h para determinar que las muestras habían alcanzado el equilibrio. Las medidas en el equilibrio se realizaron a la longitud de onda más apropiada (230, 280 y 290 nm), dependiendo de la concentración de RepB. En todos los casos, la señal de línea base fue adquirida después de centrifugar a alta velocidad. El cálculo de la masa molecular (M_r) de RepB se realizó mediante el ajuste de los datos experimentales a la expresión [5], usando el programa EQASSOC (Minton, 1994):

$$M_r = 2RT/(1-\nu\rho)\omega^2 \times d(\ln c)/dr^2 \quad [5]$$

donde c es la concentración de RepB en g/l, r es la distancia radial desde el eje de rotación, ω es la velocidad angular del rotor, ν es el volumen específico parcial de RepB, ρ es la densidad del solvente, R es la constante de los gases y T la temperatura absoluta. El volumen específico parcial de RepB (0,749 ml/g) fue calculado a partir de la composición de aminoácidos con el programa SEDNTERP (Laue *et al.*, 1992).

2.8.2. Velocidad de sedimentación.

Para estos ensayos se utilizaron muestras de 350 μ l con diferentes concentraciones (1 a 10 μ M) de RepB en tampón UA. Los experimentos se realizaron a 45.000 rpm, a una temperatura de 20 °C, y las muestras fueron cargadas en celdas de doble sector. Para calcular el coeficiente de sedimentación de RepB, se realizó un análisis $l_s-g^*(s)$ (del inglés “least-squares $g^*(s)$ boundary analysis”) de la distribución del coeficiente de sedimentación. El método $l_s-g^*(s)$ se basa en el análisis de los datos por mínimos cuadrados, y el termino $g^*(s)$ indica que se trata de la distribución del coeficiente de sedimentación aparente, ya que no se ha tenido en cuenta la difusión.

El análisis de los perfiles de sedimentación por este método se realizó usando el programa SEDFIT (Schuck and Rossmanith, 2000).

El coeficiente de sedimentación fue corregido para las condiciones estándar usando el programa SEDNTERP, con lo que se obtuvo el correspondiente valor de $S_{20,w}$. El valor del coeficiente de fricción translacional de RepB (f) fue determinado a partir de la masa molecular y del coeficiente de sedimentación de la proteína (van Holde, 1985), mientras que el coeficiente de fricción de la esfera hidratada equivalente (f_0) fue estimado usando una hidratación de 0,42 g de agua por g de proteína (Pessen and Kumosinsky, 1985). Con estos valores se pudo calcular la relación de fricción translacional (f/f_0), que nos proporcionó una estimación sobre la forma de RepB.

2.9. EXPERIMENTOS DE ENTRECruzAMIENTO.

El entrecruzamiento o “cross-linking” es el proceso químico de unión de dos o más moléculas de forma covalente. Los agentes de entrecruzamiento contienen en sus extremos grupos que son reactivos frente a grupos funcionales específicos (aminas primarias, sulfhidrilos, etc.) que se encuentran en proteínas u otras moléculas. El uso de agentes de entrecruzamiento ha facilitado la determinación de interacciones entre moléculas cercanas, de la estructura tridimensional de proteínas, y de las asociaciones moleculares en membranas. Otros usos incluyen la modificación de ácidos nucleicos, compuestos químicos y superficies sólidas. Los cambios de conformación de una proteína asociados con una determinada interacción pueden ser analizados realizando entrecruzamiento antes y después de que suceda la interacción. Al comparar el éxito de la conjugación con diferentes agentes con la longitud del espaciado entre los grupos reactivos, podemos obtener información sobre la distancia entre las moléculas que interaccionan.

Los agentes de entrecruzamiento pueden ser de dos tipos, homobifuncionales o heterobifuncionales. Los agentes homobifuncionales contienen dos grupos reactivos idénticos, y se emplean para unir proteínas entre sí, incluso cuando se trata de proteínas diferentes, o para estabilizar estructuras cuaternarias. Los agentes heterobifuncionales presentan dos grupos reactivos distintos que permiten una unión secuencial que ayuda a prevenir fenómenos de polimerización o autoconjugación no deseados. La elección de un agente de entrecruzamiento se realiza en base a diferentes factores: reactividad de sus grupos funcionales, longitud del brazo espaciador, solubilidad en agua y permeabilidad en membranas celulares, si el enlace covalente es reversible, o si el agente puede ser etiquetado mediante marcaje radiactivo o de otro tipo. En la mayoría de las aplicaciones es necesario mantener la estructura nativa del complejo de proteínas, de manera que los ensayos de entrecruzamiento se realizan normalmente en condiciones de pH y tampón suaves. Además, la relación molar óptima entre agente de entrecruzamiento y proteína es un factor importante dependiendo de la aplicación que se quiere desarrollar. Por ejemplo, dependiendo del número de grupos funcionales que presente una proteína en la superficie podremos aumentar o disminuir la relación agente-proteína.

2.9.1. Tratamiento in vitro con BS³ y DSP de la proteína RepB purificada.

Tanto en los tratamientos *in vitro* como *in vivo*, las soluciones stock de agente de entrecruzamiento se prepararon justo antes de usarlas. La solución de BS³ se preparó a una concentración de 25 mM en tampón Hepes 50 mM, pH 8,0. La solución de DSP se preparó 25 mM en DMSO.

En las reacciones de entrecruzamiento *in vitro* se incubó 2 µM de proteína RepB pura con concentraciones crecientes de BS³ o DSP en 10 µl de tampón Hepes 20 mM, pH 8,0, con 100 mM de KCl, durante 30 min y a t.a. La reacción de entrecruzamiento se detuvo añadiendo Tris-HCl, pH 7,5, hasta una concentración final de 100 mM. Las muestras se analizaron en geles de PAA (10%)/SDS.

2.9.2. Tratamiento in vivo con BS³ y preparación de extractos de proteína total de *S. pneumoniae*.

Estos experimentos se realizaron a partir de un cultivo (~50 ml) de *S. pneumoniae* con cualquiera de los plásmidos de interés, crecido en AGCH (suplementado con Tc 1 µg/ml) hasta una OD₆₅₀ de 0,2-0,3 (aprox 0,4-1 x 10⁸ células/ml). A continuación, las células se recogieron por centrifugación a 10.000 rpm, durante 10', a 4 °C, y se lavaron con 10 ml de tampón Hepes 50 mM, pH 8,0, previamente enfriado. Las células sedimentadas se resuspendieron en 12,5 ml de Hepes 50 mM pH 8,0, y la suspensión se repartió en alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf de 2 ml que se centrifugaron para obtener un sedimento celular. Estos sedimentos, por tanto, provenían de 1 ml de una suspensión celular cuatro veces más concentrada que el cultivo original. Para poder usar los sedimentos celulares en los siguientes pasos del entrecruzamiento, se conservaron a -20 °C.

Cada reacción de entrecruzamiento se realizó resuspendiendo cada sedimento en 200 µl de tampón de permeabilización con la concentración de agente BS³ deseada. La solución de BS³ "stock" se preparó en el momento a una concentración de 25 mM en Hepes 50 mM pH 8,0. Tras 20 min de incubación a t.a., la reacción se paró añadiendo 40 µl de Tris 1M pH 8,0. La suspensión se enfrió en hielo y las células se recogieron por centrifugación. Para aumentar la concentración de proteínas en el extracto final, las reacciones de entrecruzamiento se realizaron por duplicado y se juntaron en este paso. Los sedimentos, que provenían de dos reacciones, se resuspendieron en 200 µl de tampón de lisis de neumococo (0,15% de DOC), y se incubaron durante 10 min a 37 °C. Para clarificar el extracto viscoso de lisis se añadieron 20 µl de SDS al 10%, y se incubó durante 5 min a 65 °C. Las muestras se prepararon para la electroforesis en geles de PAA(10%)/SDS añadiendo 55 µl de SLB 5X. Para eliminar restos celulares que pudieran interferir en la electroforesis, las muestras se centrifugaron a 13 K durante 5 min. El sobrenadante se conservó a -20 °C hasta el momento de la carga.

2.10. DETECCIÓN Y ANÁLISIS DE LOS COMPLEJOS RepB-DNA POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

La formación de los complejos entre RepB y el DNA se realizó como se describe en el apartado 2.5.1. Las reacciones de unión (4 μ l de volumen total) contenían una concentración de 3,6 nM del fragmento 1.825, y 7 nM del fragmento 700 (Tabla 3), alcanzándose una relación molar proteína:DNA de 115:1 y 60:1 respectivamente. Después de 20 min de incubación a t.a., los complejos fueron fijados por la adición de 0,2% (v/v) de glutaraldehído. Para la preparación de las muestras, las reacciones de unión fueron diluidas 20 veces en tampón ME (Tabla 5).

Los complejos RepB-DNA fueron adsorbidos a láminas de mica recién exfoliada de 1 cm². Tras 1-2 min de incubación, las láminas de mica fueron lavadas con agua y los complejos fueron teñidos con acetato de uranilo al 2%. Seguidamente, se retiró el exceso de agente de tinción y las muestras fueron sombreadas por evaporación de platino/iridio de manera rotatoria (Spiess and Lurz, 1988). Finalmente, el sombreado metálico fue cubierto por una fina capa de carbón. Para visualizar las muestras al microscopio electrónico, la réplica metálica fue flotada sobre una gota de agua y depositada sobre una rejilla de cobre. Las micrografías fueron tomadas con un microscopio electrónico Philips CM100, a 100 kV y con una cámara CCD "Fastscan" acoplada.

Las medidas de la longitud del contorno de las moléculas de DNA se realizaron sobre proyecciones de negativos de 35 mm usando un digitalizador LM4 (Brühl). Los datos obtenidos de estas medidas fueron analizados estadísticamente con la ayuda del programa SIGMAPLOT.

2.11. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS LIBRES DE CÉLULAS Y REPLICACIÓN *IN VITRO* DE pT181.

2.11.1. Preparación de los extractos de replicación.

Se prepararon extractos libres de células de estafilococos para los ensayos de replicación *in vitro* a partir de DNA plasmídico superenrollado. Los extractos se realizaron con las estirpes *S. aureus* RN4220 y *S. aureus* RN4220-*pcrA3*, siguiendo el método descrito en (Birch and Khan, 1992). El extracto proteico final se equilibró por diálisis en tampón TDE (Tabla 5). La concentración de proteínas del extracto se determinó mediante el empleo del reactivo BCA (Bio-Rad). La concentración de proteínas obtenida en los extractos de ambas estirpes de *S. aureus* fue de 15 mg/ml.

2.11.2. Ensayos de replicación *in vitro* de pT181 en extractos libres de células.

Estos ensayos se realizaron como se describe en (Chang *et al.*, 2000). Las reacciones de replicación se llevaron a cabo en 30 μ l de tampón RE (1X) con 1 μ l de

[γ - 32 P] ATP (3.000 Ci/mmol), alrededor de 600 μ g de extracto de proteínas, 500 ng de DNA de pT181cop608, 200 ng de proteína iniciadora RepC y cantidades de proteína His₆-PcrA que variaron entre 50 y 200 ng. Tras un periodo de incubación de 1 h a 32 °C, la reacción se terminó por la adición de un volumen igual de solución STOP 2X (2 mg/ml de Proteinasa K, SDS 0,2% y EDTA 50 mM) seguida de 10 min de incubación a 37 °C. Las muestras se sometieron a dos extracciones consecutivas con fenol y una mezcla 1:1 (v/v) de fenol y cloroformo-isoamílico (24:1), y el DNA fue recuperado por precipitación con etanol. Las muestras, que se disolvieron en tampón de carga BXGE 1X, fueron analizadas por electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón TBE, en presencia de 1 μ g/ml de BrEt. La electroforesis se realizó o/n a un voltaje constante de 3 V/cm y a temperatura ambiente. Después de visualizar los geles por luz UV, se secaron a 80 °C y los productos de la reacción de replicación se detectaron por autorradiografía.

2.11.3. Ensayos de replicación in vitro de pT181 con DnaE.

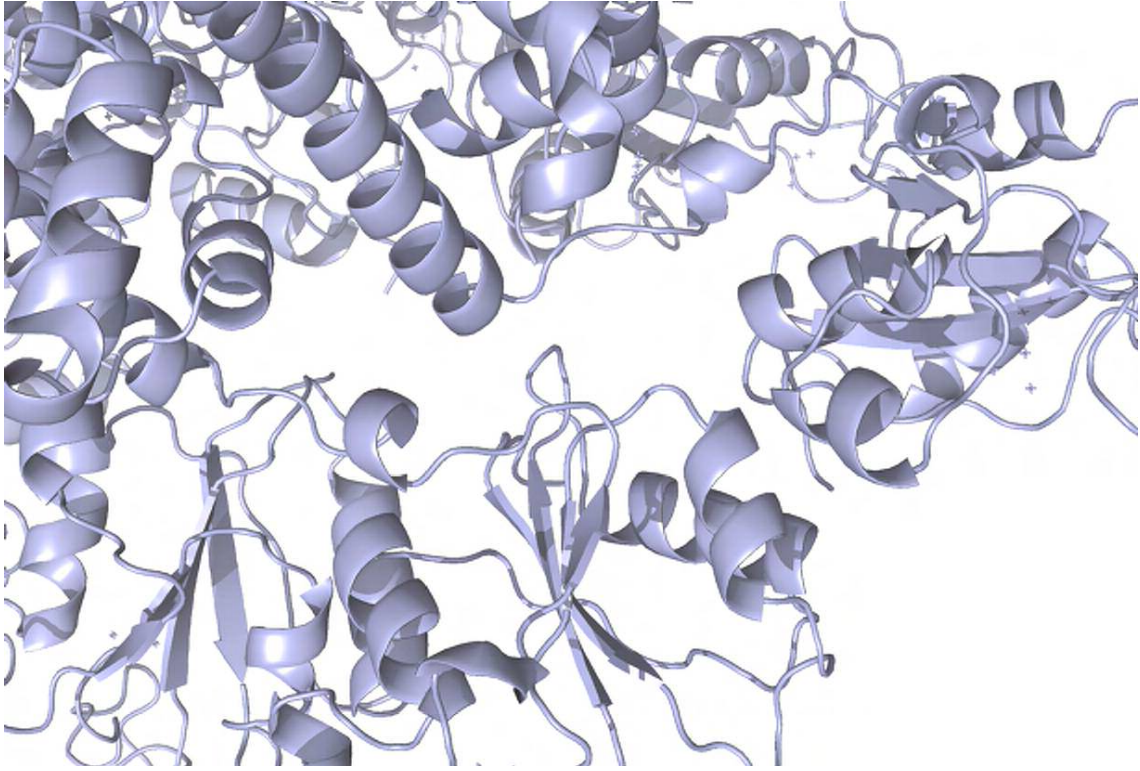
Los ensayos de replicación se realizaron esencialmente como se describe en (Bruck and O'Donnell, 2000), con las modificaciones necesarias para la replicación de pT181. Las reacciones se llevaron a cabo en 21,5 μ l de tampón RP, con 500 ng de DNA de pT181, 300 ng de DnaE, 4 mM de ATP y 60 μ M de dCTP y dGTP. Para iniciar la replicación del DNA de pT181, fue necesario añadir a la reacción 200 ng de la proteína iniciadora RepC, así como 100 ng de His₆-PcrA. La reacción se preincubó durante 2 min a 37 °C para permitir el ensamblaje de la polimerasa en el extremo del cebador. La síntesis del DNA se inició con la adición de 3,5 μ l de una solución 0,5 mM dTTP, 0,25 mM dATP y 1 μ M de [α - 32 P] dATP (3.000 Ci/mmol). La síntesis transcurrió a 37 °C durante 10 min y se terminó por la adición de un volumen igual de solución STOP 2X (2 mg/ml de Proteinasa K, SDS 0,2% y EDTA 50 mM) seguida de 10 min de incubación a 37 °C 10. Los productos de la reacción fueron analizados en geles de agarosa al 0,8%, en tampón TBE, que se secaron y se sometieron a exposición autorradiográfica.

2.12. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ENTRE PcrA Y RepC

La interacción entre la proteína iniciadora RepC y la helicasa PcrA se analizó mediante experimentos de “pull-down”. En estos ensayos, una de las dos proteínas se fija a una matriz sólida por la que se hace pasar una solución que contiene la otra proteína. La unión entre ambas proteínas se detecta mediante la separación de los complejos de la matriz sólida y su posterior análisis.

En este caso, se incubaron 200 μ l de extracto de lisis procedente de un cultivo de *E. coli* que contenía la proteína de fusión MBP-RepC sobreproducida, con 100 μ l de resina amilasa equilibrada en el propio tampón de lisis (Chang *et al.*, 2000) durante 1 h a 4 °C. Tras la adsorción de MBP-RepC a la resina, la mezcla se lavó con tampón A (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 200 mM KCl, 10 mM β -ME) con un 1% de BSA. A continuación, se añadieron 5 μ g de proteína His₆-PcrA, disuelta en 1 ml de tampón

TEKEM, y se incubó a 4 °C, con agitación suave, durante 1 h. Tras este periodo de incubación, se realizaron tres lavados con tampón TEKEM, para eliminar el exceso de proteína no unida, y el resto de la muestra fue recuperada directamente en tampón de carga SLB, calentando la solución 3 min a 95 °C. Como control, se realizó el mismo tipo de ensayo pero incubando His₆-PcrA con resina amilasa sin proteína MBP-RepC unida. Los extractos de proteínas se analizaron mediante “Western-blot” con anticuerpos monoclonales frente a las etiquetas MPB e His₆. La visualización de las bandas, que fueron reconocidas específicamente por los anticuerpos, se realizó con sistema ECL (Amersham Biosciences) de quimioluminiscencia.



RESULTADOS

CAPÍTULO 1:

INICIACIÓN DE LA REPLICACIÓN DE pMV158: INTERACCIÓN ENTRE LA
PROTEÍNA INICIADORA DE LA REPLICACIÓN RepB Y EL ORIGEN DE
REPLICACIÓN DE CADENA DOBLE

Para analizar la función que desempeñan tanto RepB como el DNA en el proceso de iniciación de la replicación de pMV158, diseñamos una serie de experimentos para estudiar las características de la unión de la proteína al DNA del *dso*. Estos ensayos se realizaron utilizando DNA superenrollado del plásmido o fragmentos de DNA que contenían las secuencias de su *dso*. Mediante ensayos de retardo en gel identificamos y caracterizamos los complejos formados por la unión de RepB a las distintas partes del *dso*. Los contactos que se establecen entre RepB y el DNA del *dso* se analizaron, tanto en DNA lineal como en superenrollado, mediante técnicas de “footprinting”, las cuales nos permitieron asimismo determinar otros aspectos de la interacción entre RepB y el *dso*, como la inducción de cambios en la topología del DNA. Los resultados de estos experimentos se muestran a continuación.

1. Detección y análisis, mediante ensayos de retardo en gel, de los complejos formados por la unión de RepB al DNA del *dso*.

Para estos ensayos se utilizó una preparación de proteína RepB pura obtenida con el nuevo método de purificación descrito en esta tesis (apartado 2.1 de Métodos). Para observar los complejos RepB-DNA del *dso* se realizaron ensayos de retardo en gel con fragmentos de DNA que contenían el locus *bind*, el locus *nic*, o el *dso* entero, y con diferentes relaciones proteína:DNA. Las reacciones de unión se realizaron tal y como se describe en el apartado 2.5 de Métodos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los complejos RepB-DNA del *dso* fueron analizados en geles nativos de PAA al 5 %.

En la unión de RepB a los loci *nic* o *bind* se observaron dos complejos, denominados C1 (el de mayor movilidad electroforética) y C2 (el que migraba más lentamente) (Figura 15). El complejo C1 apareció a una menor relación proteína a DNA cuando se empleó el fragmento que contenía el locus *bind* que cuando se usó el que contenía el locus *nic* (no se muestra). Este hecho sugería una mayor afinidad de unión de RepB por las DDR que por el DNA del locus *nic*. Con ambos fragmentos, el complejo C2 sólo se detectó cuando la mayoría del DNA estaba en el complejo C1, lo que indica que la formación de C2 no se ve facilitada por la generación del complejo C1. De hecho, al analizar las fracciones de DNA libre y en los complejos C1 y C2 con la aproximación descrita en (Senear and Brenowitz, 1991) para un sistema de dos sitios de unión, no se pudo deducir que la unión de RepB fuera cooperativa (apartado 2.5.3 de Métodos). Según esta aproximación, los ensayos de retardo en gel pueden proporcionar información útil para la demostración de cooperatividad en la unión a DNA de proteínas con especificidad de secuencia. Los ensayos de retardo en gel proporcionan una estimación de las constantes macroscópicas de unión durante los eventos de formación de sucesivos complejos nucleoproteicos, ya que permiten separar cada una de las especies en base al número de sitios ocupados por la proteína. En el caso más simple, en el que existen dos sitios idénticos de unión de la proteína, se pueden determinar con precisión efectos cooperativos de hasta 1.000 veces. Cuando los sitios de unión son distintos, como es el caso del *dso* de pMV158,

los efectos cooperativos débiles pueden ser encubiertos por la heterogeneidad en la afinidad de unión intrínseca de la proteína a uno y otro sitio.

Cuando usamos el fragmento que contiene el *dso* entero observamos un tercer complejo C3, que apareció a elevadas concentraciones de proteína, coincidiendo con la aparición de agregados que no atravesaban la trama del gel de PAA. Empleando la aproximación anterior en un hipotético sistema de tres sitios que sólo considera efectos cooperativos entre pares (Senear and Brenowitz, 1991), no pudimos deducir cooperatividad positiva en la aparición del complejo C2 desde el C1, o del C3 desde el C2. Las características de los complejos formados por RepB y el DNA que contiene el *dso* entero fueron estudiadas mediante ensayos de “footprinting” con radical hidroxilo (HO•) y con agentes metilantes como el DMS (véase el siguiente apartado). Los resultados de estos ensayos mostraron que, mientras en el complejo C1 sólo las DDR estaban protegidas por RepB, tanto el locus *bind* como el *nic* aparecían contactados en el complejo C2. La formación del complejo C3 tendría lugar por la interacción de otras moléculas de RepB con el complejo C2 a través de interacciones con el DNA o con la proteína previamente unida, de una manera similar a la propuesta para la aparición del complejo C2 desde el C1 en la unión de RepB a los fragmentos *nic* o *bind* (véase más adelante).

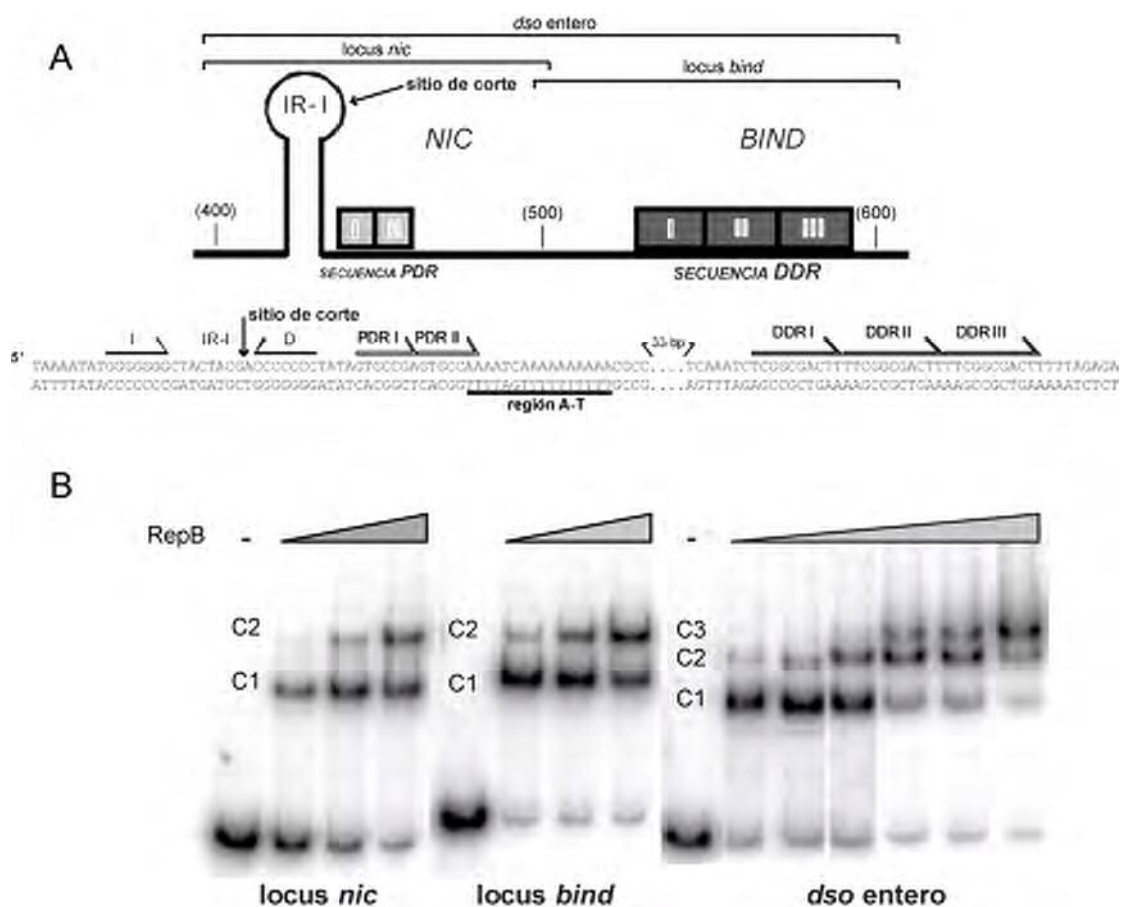


Figura 15. **El origen de replicación de doble cadena de pMV158 y su interacción con RepB.** (A) Representación esquemática (parte superior) y secuencia de nucleótidos (parte inferior) del *dso* de pMV158. Esta región se divide en dos loci, el locus *bind* con las repeticiones DDR, y el locus *nic* que incluye las repeticiones PDR y la repetición invertida IR-I (donde I y D indican los brazos izquierdo y derecho respectivamente) que genera el lazo donde se localiza el dinucleótido 5'-GpA-3' cortado por RepB. Los tres fragmentos de DNA usados en B están representados sobre el esquema. Como referencia, algunas coordenadas de la secuencia de pMV158 se indican entre paréntesis. También se muestran las dos repeticiones (I y II) que constituyen las PDR, y las tres repeticiones (I, II y III) que componen las DDR. La región rica en pares de bases A+T situada entre las secuencias PDR y DDR se indica en la parte inferior de la secuencia. (B) Los complejos formados entre RepB y el DNA del origen de replicación. La proteína se incubó con fragmentos de DNA marcado que contenían el locus *nic*, el locus *bind* o el *dso* entero. Las concentraciones de RepB fueron 0 (-), 0,3, 0,4 y 0,5 μ M en las reacciones que incluían el locus *nic* o *bind*, y 0 (-), 0,3, 0,5, 0,7, 1,2, 1,5, 1,7 μ M en las reacciones con el fragmento de DNA que contenía el *dso* entero. En las imágenes se indican los diferentes complejos.

2. Análisis de alta resolución de los contactos entre RepB y el DNA del *dso*.

Los contactos que se establecen en la interacción entre RepB y su DNA diana se analizaron mediante ensayos de “footprinting” con HO• y DMS. Se analizaron los complejos C1 y C2 generados por la unión de RepB al *dso* entero o a cada uno de los loci (*nic* y *bind*). El complejo C3 RepB-*dso*, generado por la unión de la proteína al *dso* entero, no pudo ser aislado y, por tanto, caracterizado, debido a su proximidad con el complejo C2. Se utilizaron fragmentos de DNA marcados en el extremo 5' de una u otra cadena (codificante o no-codificante). La modificación del DNA con HO• se realizó antes de separar por electroforesis los diferentes complejos y el DNA libre. Sin embargo, el tratamiento con DMS fue posterior a la separación de las distintas especies de DNA, y se realizó “in situ” sobre el gel separador. Finalmente, las muestras se analizaron en geles de secuencia de PAA al 8 % y 7 M de urea (apartado 2.5.7 de Métodos).

El análisis de la protección mediada por RepB frente a la rotura del DNA por HO• en el complejo C1 RepB-*dso* mostró cuatro regiones fuertemente protegidas dentro del locus *bind* (indicando la saturación de las DDR), en tanto que se observaron protecciones débiles (alrededor de un 15 %) en el locus *nic*. El patrón de protección del DNA en el complejo C2 RepB-*dso* fue el mismo que el observado en C1 para el locus *bind* (lo que corroboraba la saturación de las DDR por RepB en el complejo de mayor movilidad electroforética), pero difería significativamente de él en el locus *nic* (Figura 16). En el complejo C2, las protecciones en esta región aparecían más fuertes (30-60 %) y se extendían a otras bases que no estaban protegidas en C1. Estos resultados, junto con el patrón de protección del complejo C1 resultante de la unión de RepB al DNA del locus *nic* separado (véase más adelante), sugieren que, mientras que en el complejo C1 RepB-*dso* entero la proteína sólo ocupa el locus *bind*, en el complejo C2 ambos loci (*nic* y *bind*) están ocupados por RepB.

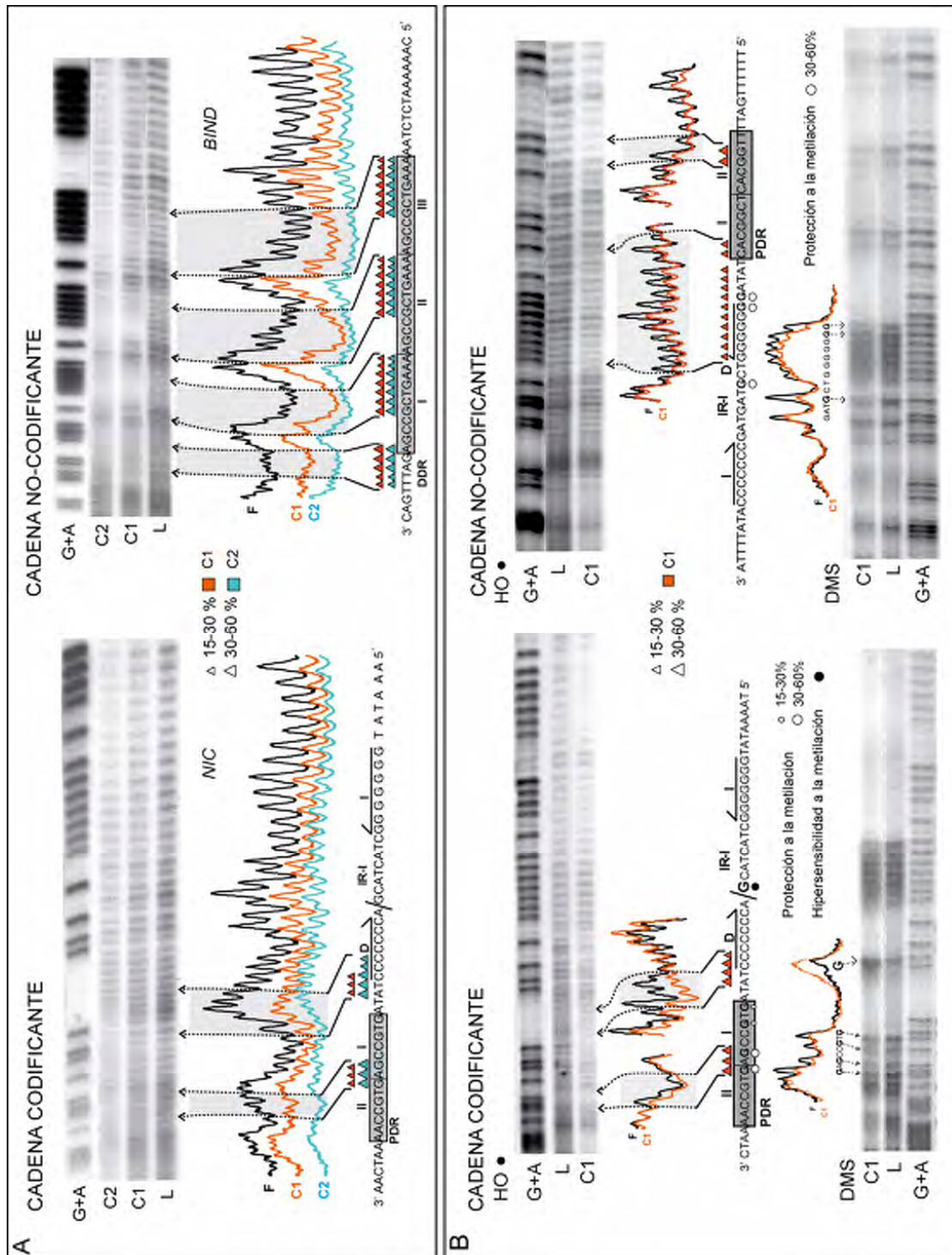


Figura 16. **Identificación de los contactos de RepB con el *dso* entero (A) o con el locus *nic* (B).** Fragmentos de DNA marcados radiactivamente en el extremo 5' de la cadena indicada se incubaron con RepB. Los complejos generados fueron tratados con OH• (A y B) o con DMS (B) como se describe en el apartado 2.5.7 de Métodos. Los geles de secuencia muestran el perfil de modificación de la región 5' de la cadena codificante o no-codificante. Entre la imagen del gel y la correspondiente secuencia de nucleótidos se muestra el densitograma del DNA sin proteína (en negro) y de los complejos C1 (en rojo) y C2 (en azul). Para facilitar la visualización de protecciones débiles en B, los densitogramas correspondientes al DNA libre y acomplejado están superpuestos en las regiones protegidas. Las secuencias PDR y DDR están sombreadas. La repetición invertida IR-I se muestra con sus brazos derecho (D) e izquierdo (I). La barra inclinada indica el sitio específico de corte. Las bases cuyas desoxirribosas están

protegidas de la digestión por OH● están indicadas con triángulos de diferente tamaño (según el grado de protección). En B, se muestran las bases hiperexpuestas (círculos negros) o protegidas (círculos abiertos) por RepB frente a la metilación por DMS.

Debido a la baja estabilidad que, como veremos, caracteriza a los complejos RepB-*nic*, las protecciones débiles del locus *nic* en el complejo C1 RepB-*dso* entero podrían proceder de la rotura por HO● de moléculas de DNA con RepB unida a ambos loci (complejo C2), de las que posteriormente se disociaría la proteína unida al locus *nic* (generándose C1) antes de la separación electroforética de los distintos complejos. Este fenómeno daría lugar a una fracción de moléculas que migrarían como complejo C1 pero exhibirían el patrón de protección de C2.

La interacción entre RepB y el locus *nic* también fue analizada en el complejo C1 generado por la unión de RepB al fragmento que sólo contiene este locus. Se analizó el patrón de protección frente a HO● y a DMS en ambas cadenas del DNA. Las protecciones observadas en el esqueleto azúcar-fosfato de la cadena codificante coinciden con las de la misma cadena del complejo C2 RepB-*dso*, aunque las protecciones más débiles de este último no se detectaron en el complejo C1 RepB-*nic*. Las dos zonas de protección frente a HO● en la cadena codificante están localizadas a 3' del sitio de corte, en una región del DNA que solapa con las PDR y el brazo derecho de la repetición invertida IR-I (Figura 16 B). En la cadena no-codificante, los contactos de RepB con el esqueleto del DNA se localizan en las PDR y a 3' de las mismas, en una región adyacente a la secuencia complementaria al sitio de corte (Figura 16 B). De los resultados obtenidos al analizar las protecciones en ambas cadenas, deducimos un esquema de los contactos de RepB con el locus *nic* en el cual sólo se establecen contactos con el esqueleto del DNA a la derecha del sitio específico de corte. Un grupo de protecciones se sitúa en el brazo derecho de IR-I, y el otro en la región cercana que contiene las repeticiones directas PDR. Cuando se empleó el DMS como agente modificante del DNA, se observaron interacciones específicas de RepB con residuos de guanina (G) a través del surco mayor del DNA (Figura 16 B). En la cadena codificante, las Gs protegidas estaban confinadas a las dos primeras repeticiones (I y II) de las PDR, mientras que en la cadena no-codificante, las protecciones se situaban en la secuencia central y en el brazo derecho del elemento IR-I. Cuando se analizó la reactividad al DMS de la cadena codificante, se observó una banda claramente sobreexpuesta que corresponde a la G del sitio de corte. De acuerdo con la interpretación de los patrones de reactividad frente a DMS, el incremento de la metilación de los residuos de guanina puede deberse a un aumento local de la hidrofobicidad (Shaw and Stewart, 1994) como consecuencia de la proximidad de una región de RepB con esas características.

Los resultados del estudio de la interacción de RepB con el locus *bind*, mediante el análisis del patrón de protección frente a DMS en cada una de las cadenas del DNA (Figura 17), confirma la descripción de la secuencia DDR como el sitio primario de unión (de la Campa *et al.*, 1990). RepB interacciona a través del surco mayor del DNA con los tres mismos residuos de guanina de cada repetición directa. La unión de RepB también provoca el aumento de la reactividad al DMS de algunos residuos de guanina y citosina de cada una de las repeticiones de la secuencia DDR.

La reactividad frente al DMS de los residuos de citosina es un indicador de cambios locales en la conformación del DNA, tales como desenrollamiento o distorsión de la doble hélice. Para determinar si la unión de RepB a las DDR induce la apertura de las dos hebras del DNA, realizamos un ensayo de “footprinting” con permanganato potásico del mismo complejo C1 RepB-*bind*. Los resultados no mostraron que la unión de RepB produjera la apertura del DNA de las DDR (no se muestra).

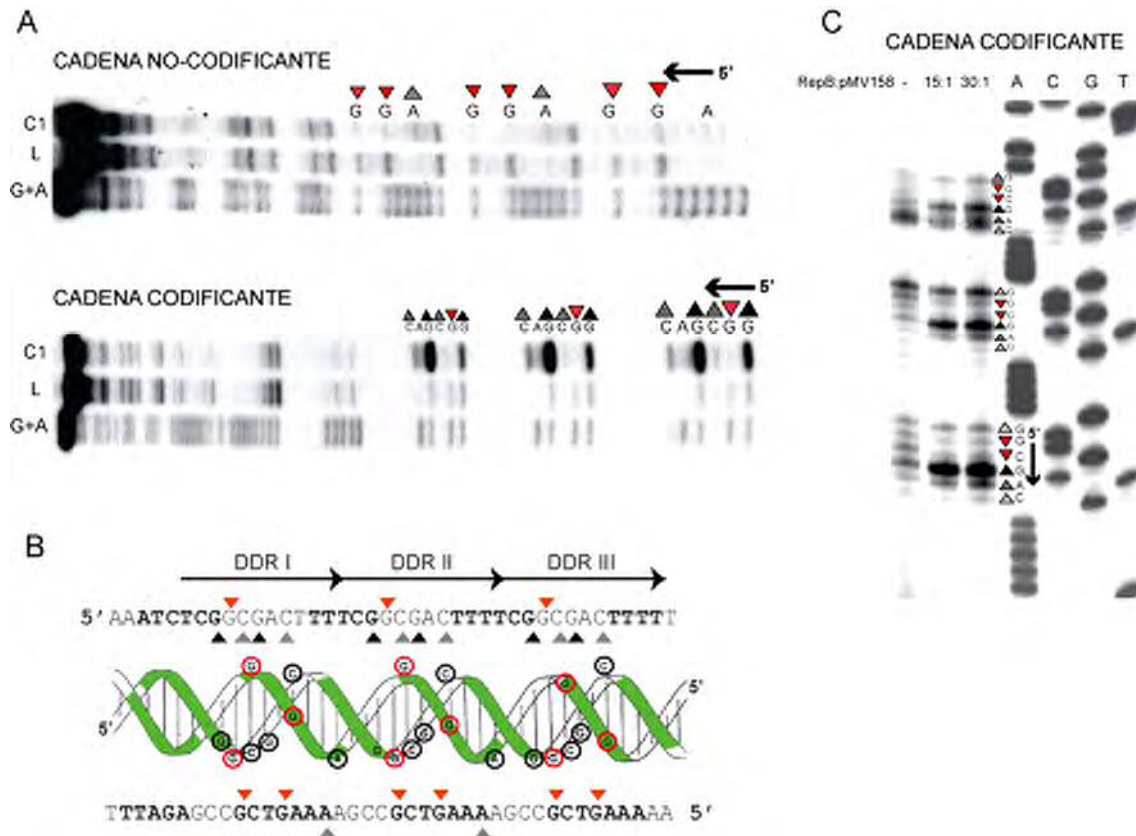


Figura 17. **Identificación de los contactos entre RepB y el locus *bind*.** (A) Perfil de metilación por DMS del DNA del locus *bind* unido a RepB. Se muestran las bases hipermetiladas (triángulos grises o negros dependiendo de si hay ligero o marcado aumento, respectivamente, de la sensibilidad al DMS) o protegidas (triángulos rojos) por la unión de RepB en cada una de las cadenas de DNA del locus *bind*. En la parte superior de los geles se muestra la secuencia de las regiones contactadas en la dirección 5'→3'. Calles: L, DNA libre; C1, DNA del complejo 1; G+A, marcador de secuencia para purinas de Maxam y Gilbert. (B) Esquema de la doble hélice del B-DNA de la región de las DDR junto con la secuencia de ambas cadenas. Las bases cuyas desoxirribosas están protegidas de la digestión por OH• se muestran en negrita sobre la secuencia de nucleótidos, o como regiones en verde sobre la doble hélice. Las bases hipermetiladas (triángulos grises/negros, o letras dentro de círculos negros) o protegidas de la metilación (triángulos rojos, o letras dentro de círculos rojos) por la unión de RepB se indican en la secuencia y sobre la doble hélice del DNA. Las tres repeticiones que constituyen la secuencia DDR se indican con flechas. (C) Perfil de metilación por DMS del locus *bind* en el DNA superenrollado de pMV158 unido a RepB. Las bases metiladas en la cadena codificante fueron identificadas por las paradas de la extensión de la cadena no-codificante con el oligo dso4. Este mismo oligo se usó para preparar el marcador de secuencia (calles A, C, G, T). En la parte derecha del gel se muestra la secuencia de las regiones contactadas en la dirección 5'→3'.

Al representar los “footprints” frente a HO• y DMS en la doble hélice del DNA del locus *bind* de pMV158 (Figura 17 B), se pudo observar que RepB interacciona con las DDR a través de la misma cara de la doble hélice, generando una distorsión significativa sobre el DNA. Además, se observó un claro patrón de repetición de las protecciones (Figura 17 B), lo que sugiere que el hexámero de RepB interacciona con la secuencia DDR a través de tres sitios de unión a DNA idénticos. Los contactos de RepB con el locus *bind* del *dso* de pMV158 también se analizaron sobre DNA superenrollado. El perfil de variación de la reactividad a DMS tras la unión de RepB fue similar al encontrado en el mismo locus *bind* sobre DNA lineal (Figura 17 C).

El análisis de las protecciones en los complejos C2 formados por RepB y los fragmentos de DNA *bind* o *nic* no mostró ninguna región de contacto adicional con respecto al complejo C1, aunque sí ligeras variaciones en el patrón de protección. Este resultado sugiere que la formación del complejo C2 puede deberse a la unión de nuevas moléculas de RepB, a través de interacciones proteína-proteína o proteína-DNA, a la región previamente contactada por RepB en el complejo C1.

3. Estabilidad de los complejos RepB-DNA.

Para calcular la estabilidad de la unión de RepB a los loci *nic* y *bind* del *dso* se analizaron las cinéticas de disociación de los complejos C1 generados con cada una de estas regiones. Los fragmentos de DNA *nic* y *bind*, marcados radiactivamente en su extremo 5', se equilibraron por separado con RepB en condiciones en las que la fracción de complejo C1 era alrededor de 0,8 y no se observaba el complejo C2. A continuación, se inició la disociación irreversible del complejo RepB-DNA marcado añadiendo un exceso de 300 veces del correspondiente DNA competidor no marcado. Se recogieron muestras a distintos tiempos y se analizaron en geles de PAA (Figura 18 A) como se describe en el Capítulo 2.5.4 de Métodos. Para calcular la constante de la velocidad de disociación de RepB del DNA que contiene el locus *nic* o el *bind*, se representó el logaritmo de la fracción de complejo C1 no disociado frente al tiempo (Figura 18 B). De esta forma se estimó que la vida media del complejo C1 formado por RepB y el DNA del locus *bind* es de unos 18 min [$k_d = (0,64 \pm 0,13) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$], mientras que la disociación de RepB del DNA del locus *nic* era muy rápida y la vida media del complejo C1 (menos de un minuto) no se pudo calcular con precisión. Estos resultados muestran que la estabilidad del complejo RepB-DNA es significativamente más alta cuando RepB se une a las repeticiones directas del locus *bind*, que cuando se une a la región próxima al sitio de corte.

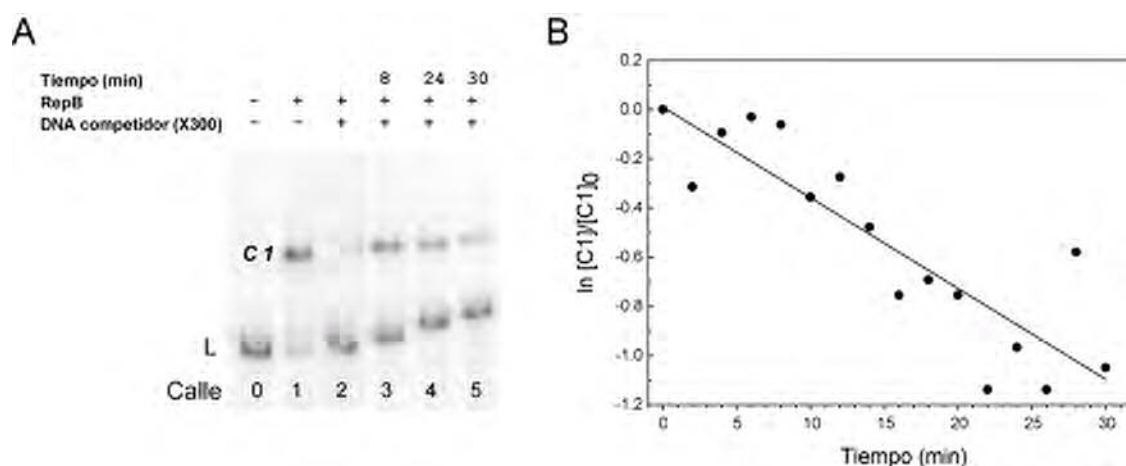


Figura 18. **Estabilidad de los complejos RepB-*bind*.** (A) La disociación del complejo C1 se inició al añadir un exceso de 300 veces del fragmento de DNA específico sin marcar. Las muestras fueron analizadas en geles nativos de PAA al 5 % a los tiempos indicados (calles 3-5). El DNA libre de proteína fue aplicado en la calle 0. Como controles se aplicaron la reacción de unión sin DNA competidor (calle 1, control de unión), o la reacción en la que el DNA marcado y sin marcar se mezclaron antes de añadir RepB (calle 2, control de competición). (B) Gráfica en la que se muestra el transcurso de la disociación del complejo RepB-*bind*. La línea representa el ajuste por mínimos cuadrados de los datos representativos a la Ecuación 2 (apartado 2.5.4 de Métodos), y los puntos representan los valores experimentales.

4. Cálculo de la afinidad relativa de RepB por las distintas regiones del dso.

Para determinar la preferencia de unión de RepB a las distintas secuencias del *dso*, se calculó su afinidad relativa por las regiones *nic* y *bind* mediante ensayos de unión competitivos. Para estos ensayos se utilizaron tres fragmentos de DNA bicatenario de distinto tamaño, que contenían, respectivamente, el locus *bind* (153 pb), el locus *nic* (119 pb), y un DNA de secuencia no específica (nsp; 75 pb). En la mezcla de reacción se añadieron simultáneamente los fragmentos *nic* y *bind*, en una relación molar de 3:1, y se incubaron a equilibrio con cantidades crecientes de proteína. El mismo tipo de ensayo se realizó para determinar la afinidad relativa de RepB por el locus *nic* con respecto al DNA nsp. Las muestras se aplicaron en un gel nativo de PAA al 5 %, y los diferentes complejos formados se identificaron y cuantificaron mediante Phosphorimager (Figura 19 A y C). Para identificar correctamente los complejos RepB-*bind*, RepB-*nic* y RepB-nsp, se realizaron simultáneamente ensayos de retardo en gel con los mismos fragmentos por separado (Figura 19 B). La afinidad relativa de RepB por las regiones *bind* y *nic* viene dada por la constante de unión relativa en el equilibrio (K_{rel}) [(Man and Stormo, 2001) y apartado 2.5.5 de Métodos]. Los resultados mostraron que la afinidad de unión de RepB por las DDR es 500 veces superior que por el DNA del locus *nic* [$K_{rel} (bind/nic) \sim 500$]. La mayor estabilidad del complejo RepB-*bind* en comparación con el complejo RepB-*nic* puede influir, al menos en parte, en la mayor afinidad de unión de RepB por las DDR. No obstante, la unión de RepB al locus *nic*, aunque de baja afinidad, es específica y presenta una afinidad 10 veces superior que

la de unión a un DNA de secuencia no específica localizada fuera del *dso* de pMV158 [$K_{rel} (nic/ DNA nsp) \sim 8$].

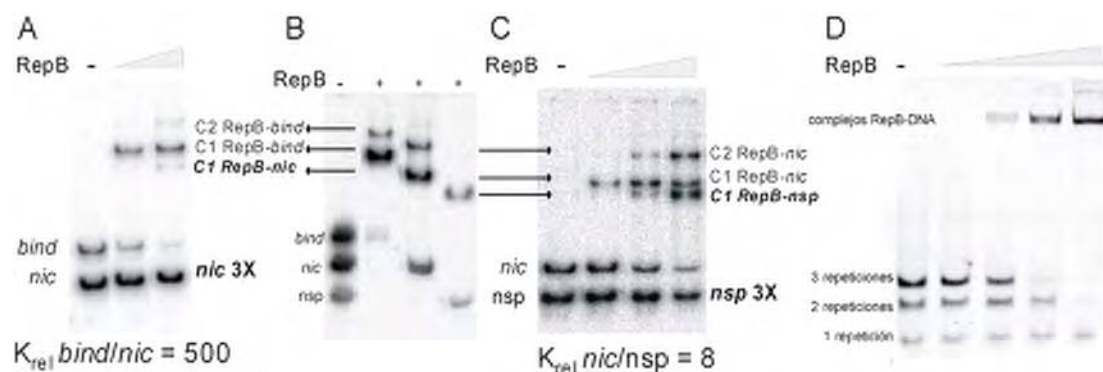


Figura 19. **Afinidad relativa de RepB por diferentes secuencias de DNA.** Los fragmentos de DNA indicados en cada caso se mezclaron e incubaron en ausencia de RepB (-) o en presencia de cantidades crecientes de proteína (desde 0,3 hasta 1 μM). La constante de unión relativa en el equilibrio (K_{rel}) fue calculada a partir de la Ecuación 3 (apartado 2.5.5 de Métodos). En la figura se muestran las afinidades relativas de RepB por el locus *bind* en comparación con el locus *nic* (A) y por el locus *nic* en comparación con un DNA de secuencia no específica (C). En estos ensayos se utilizó un exceso de 3 veces del fragmento que contenía el locus *nic* relativo al fragmento con las DDR (A), o del fragmento de DNA no específico (*nsp*) relativo al fragmento *nic* (C). En (B) se muestra el ensayo control en el que se incubó RepB con cada uno de los fragmentos de DNA por separado y mediante el cual se identificaron cada uno de los complejos RepB-DNA, que se indican mediante flechas. (D) Afinidad de unión relativa de RepB por fragmentos de DNA con 1, 2 o 3 repeticiones de las DDR. La mezcla de los tres oligos bicatenarios no marcados (0,2 μM de cada uno) se incubó con cantidades crecientes de RepB (desde 0,2 hasta 1,2 μM). Se puede apreciar que los complejos generados por la unión de RepB a los tres fragmentos no se pudieron resolver.

Otro aspecto que analizamos con respecto a la unión de RepB a su DNA diana fue su afinidad por oligos bicatenarios que comprenden una, dos o las tres repeticiones directas que constituyen las DDR, utilizando para ello ensayos de retardo en gel. Los diferentes complejos generados por la unión de RepB a estos oligos no se resolvieron correctamente por electroforesis. No obstante, pudimos observar, por la disminución de la fracción de DNA libre en función del aumento de proteína, que RepB presentaba mayor afinidad por los oligos que contenían las tres repeticiones directas que por los que contenían dos, y por éstos que por los que contenían una sola de ellas (Figura 19 D). Por tanto, *in vitro*, el hexámero de RepB se une con alta afinidad a las tres repeticiones directas que constituyen el locus *bind*.

Para comprobar si RepB presenta dos regiones distintas de unión a DNA, una por la que se uniría a las DDR, y otra para la unión al locus *nic*, se realizaron ensayos de retardo en gel en los que, una vez formados los complejos RepB-*bind* o RepB-*nic* con los correspondientes fragmentos de DNA marcados radiativamente, se añadían cantidades crecientes del fragmento complementario (*nic* o *bind*, respectivamente) no marcado. Si la hipótesis fuera cierta, sería posible observar la formación de complejos ternarios *nic*-RepB-*bind* al añadir el DNA que contiene el locus *nic* a los complejos ya formados entre RepB y el locus *bind* o viceversa. En ningún caso fue posible observar una banda radiactiva de menor movilidad electroforética que la observada para el

complejo C1 de partida, lo que indica que los complejos formados por RepB unida a ambos fragmentos de DNA no se generan. Por el contrario, la adición de grandes cantidades relativas del DNA *bind* no marcado a la mezcla en equilibrio de RepB con el DNA *nic* marcado produjo la disociación irreversible de los complejos marcados iniciales, como se esperaría si ambos DNAs compitieran por la unión de la proteína. Estos resultados sugieren que RepB se une por la misma región a las dos secuencias de DNA (no se muestra).

5. Análisis de la curvatura del DNA del *dso*.

Los resultados de experimentos realizados previamente en el laboratorio indicaron que la región del *dso* puede estar intrínsecamente curvada (de la Campa *et al.*, 1990; Pérez-Martín *et al.*, 1988). El análisis de la interacción entre RepB y el *dso* indica que la proteína reconoce la secuencia DDR como su sitio primario de unión, provocando cambios locales en la conformación del DNA. Dado que la distorsión inducida por la unión de RepB puede reflejar cambios en la topología del DNA, decidimos completar el análisis determinando la curvatura del DNA de la región *dso* de pMV158. Para estudiar tanto la curvatura intrínseca como la inducida por RepB, realizamos experimentos de permutación circular usando el vector pBEND2 (Kim *et al.*, 1989), en el que se clonaron los loci *nic* y *bind* por separado. La digestión del DNA de las construcciones así obtenidas con distintas enzimas de restricción genera fragmentos de tamaño uniforme pero que contienen la región diana localizada en diferentes posiciones respecto de uno de los extremos del fragmento (Wu and Crothers, 1984). La curvatura del DNA, ya sea intrínseca o inducida por RepB, afectará a la movilidad electroforética de los diferentes fragmentos de una manera predecible que nos permitirá calcular el ángulo de curvatura (Krüger *et al.*, 2004). El ángulo de curvatura de los diferentes fragmentos se obtuvo a partir de su movilidad electroforética relativa como se describe en (Thompson and Landy, 1988). Para calcular la movilidad electroforética de los fragmentos de DNA libres y unidos a RepB en un mismo experimento, se realizaron ensayos de retardo en gel en condiciones en las que se obtenía un 50 % de DNA acomplexado. Para eliminar la contribución de la curvatura intrínseca del DNA, la relación entre la movilidad del fragmento con el sitio diana en el centro cuando está unido a la proteína y la movilidad del mismo fragmento cuando está libre ($\mu M_B/\mu M$), se divide por la misma relación para el fragmento con la diana en un extremo ($\mu E_B/\mu E$). Este método sólo proporciona estimaciones precisas cuando la curvatura inducida es significativamente mayor que la intrínseca. Además, es posible que, aunque la curvatura inducida por la proteína coincida con la intrínseca en su localización, ambas difieran en su direccionalidad, lo que dificulta la distinción entre los efectos que producen una y otra. Por estas razones, también hemos estimado el ángulo de curvatura para el DNA libre ($\mu M/\mu E$), así como el ángulo total de curvatura del DNA unido a RepB ($\mu M_B/\mu E_B$). Los resultados (Tabla 7) mostraron que el fragmento de DNA que contenía el locus *bind* presentaba una curvatura intrínseca con un ángulo de unos 50°, mientras que el fragmento que contenía el locus *nic* era esencialmente recto. La unión de RepB al fragmento que contenía las DDR indujo en

el DNA una curvatura de unos 120° (o 105° cuando se sustrajo la curvatura intrínseca del DNA), mientras que la unión al fragmento que contenía el locus *nic* indujo una curvatura aparente de unos 60° . No obstante, el método empleado para calcular el ángulo de curvatura del DNA subestima valores superiores a 100° (Thompson and Landy, 1988), por lo que la aportación de estos resultados se resume en que RepB genera una curvatura pronunciada en el locus *bind* y sólo moderada en el locus *nic*.

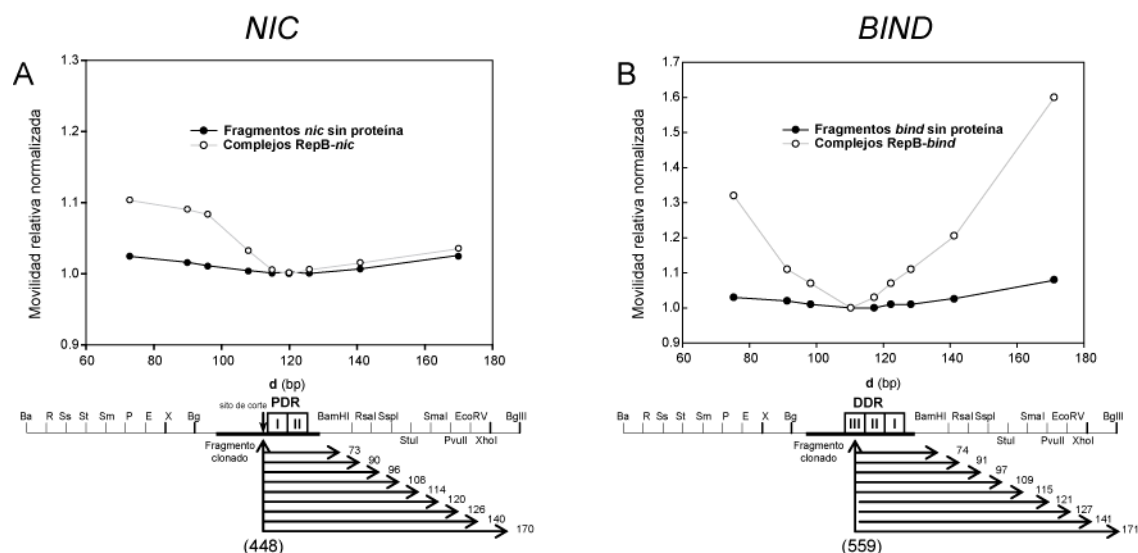


Figura 20. **Caracterización de la curvatura del DNA inducida por RepB mediante ensayos de permutación circular.** Los fragmentos permutados *nic* (241 pb) (A) y *bind* (243 pb) (B) fueron generados por digestión con las enzimas de restricción indicadas en el esquema. En el mismo esquema se muestra la distancia (d , en pb) desde el centro del fragmento de DNA de pMV158 clonado (la coordenada correspondiente se muestra entre paréntesis) hasta el extremo derecho de cada fragmento. En las gráficas se representa la movilidad electroforética de los fragmentos libres (círculos y líneas negras) o unidos a RepB (línea gris con círculos abiertos), normalizada respecto a la movilidad del fragmento de DNA del mismo tamaño más lento, libre o acomplexado y del mismo tamaño, frente a la distancia d .

Los ensayos de permutación circular también sirvieron para calcular el centro de la curvatura inducida por RepB en los loci *nic* y *bind*, ya que el fragmento que tenga la curvatura localizada en el centro será el de menor movilidad electroforética entre los de su tamaño. Para tener una referencia con respecto a la secuencia de pMV158, determinamos la coordenada del DNA plasmídico que se encontraba en el medio de cada una de las regiones de DNA clonadas. En los fragmentos permutados de 241 pb que contenían el locus *nic*, dicha coordenada era la 448 de la secuencia del DNA de pMV158, precisamente donde se encuentra el sitio de corte de RepB. El fragmento *nic* generado mediante corte con PvuII tenía la coordenada 448 justo en el medio (es decir, a unos 120 pb de cada extremo) y es el que presentó la menor movilidad electroforética, lo que indicaba que el sitio de curvatura estaba en el centro del fragmento (Figura 20 A). De esta manera, el centro de curvatura se localizó alrededor de la coordenada 448, dentro del sitio secundario de unión de RepB (Figura 16 B). El punto medio de la región clonada en los fragmentos de 243 pb que contenían el locus *bind* correspondía a la coordenada 559 de pMV158, situada en la tercera repetición

de la secuencia DDR. El fragmento *bind* de menor movilidad electroforética (el generado por digestión con *StuI*) presentaba esta coordenada a 109 pb de uno de sus extremos, mientras que la curvatura estaba centrada aproximadamente a 120 pb del mismo extremo (Figura 20 B). De esta manera, el centro de la curvatura del locus *bind* se localizó al final de la secuencia DDR, la cual corresponde al sitio primario de unión de RepB.

Tabla 7. Curvatura del DNA inducida por RepB

	Movilidad electroforética relativa ($\mu\text{M}/\mu\text{E}$) ^a <i>StuI/BglI</i>	Angulo de curvatura aparente $\alpha(^{\circ})$ ^b
locus <i>nic</i>	0,98	20
RepB- <i>nic</i>	0,88	62
locus <i>bind</i>	0,92	50
RepB- <i>bind</i>	0,61	120

^a La relación $\mu\text{M}/\mu\text{E}$ de los complejos RepB-DNA se determinó en geles de PAA al 6 %.

^b Los valores de α se calcularon a partir de las movilidades electroforéticas como se describe por Thompson and Landy (Thompson and Landy, 1988).

6. Análisis de los complejos RepB-DNA mediante microscopía electrónica.

Los resultados expuestos hasta el momento muestran que la interacción entre RepB y su sitio primario de unión, el locus *bind* del *dso*, induce curvatura del DNA y distorsión del mismo. La visualización de los complejos RepB-DNA mediante técnicas de microscopía electrónica fue la herramienta utilizada para analizar la complejidad de la ruta seguida por el DNA en su interacción con la proteína. Se realizaron una serie de experimentos en los que se midió la longitud del contorno de las moléculas de DNA (que contenían el *dso*) unidas o no a RepB, a partir de las imágenes del microscopio. Para ello, utilizamos dos fragmentos de DNA de pMV158 de tamaño diferente: uno de 1.825 pb, con el *dso* en posición asimétrica, y otro de 700 pb con el *dso* en una posición central. En el caso del fragmento de 1.825 pb, la posición asimétrica de la secuencia del *dso* facilitó la localización de los complejos nucleoproteicos en las imágenes del microscopio electrónico. Las muestras se prepararon y analizaron según se describe en el apartado 2.10 de Métodos. Las imágenes adquiridas con el microscopio electrónico nos permitieron localizar de manera muy precisa la posición del complejo RepB-DNA a 365 pb de uno de los extremos de ambos fragmentos (Figura 21 A). Ya que ambos fragmentos comparten el extremo *Bst*XI (coordenada 914 del DNA de pMV158), el complejo nucleoproteico estaría localizado alrededor de la coordenada 549 del plásmido, en la mitad de la segunda repetición de la secuencia DDR. Estos resultados confirman la especificidad de la unión de RepB al locus *bind* del *dso*. Sin embargo, no encontramos ninguna indicación de la unión de RepB al sitio secundario en el locus *nic*, probablemente debido a la baja estabilidad del complejo que se genera.

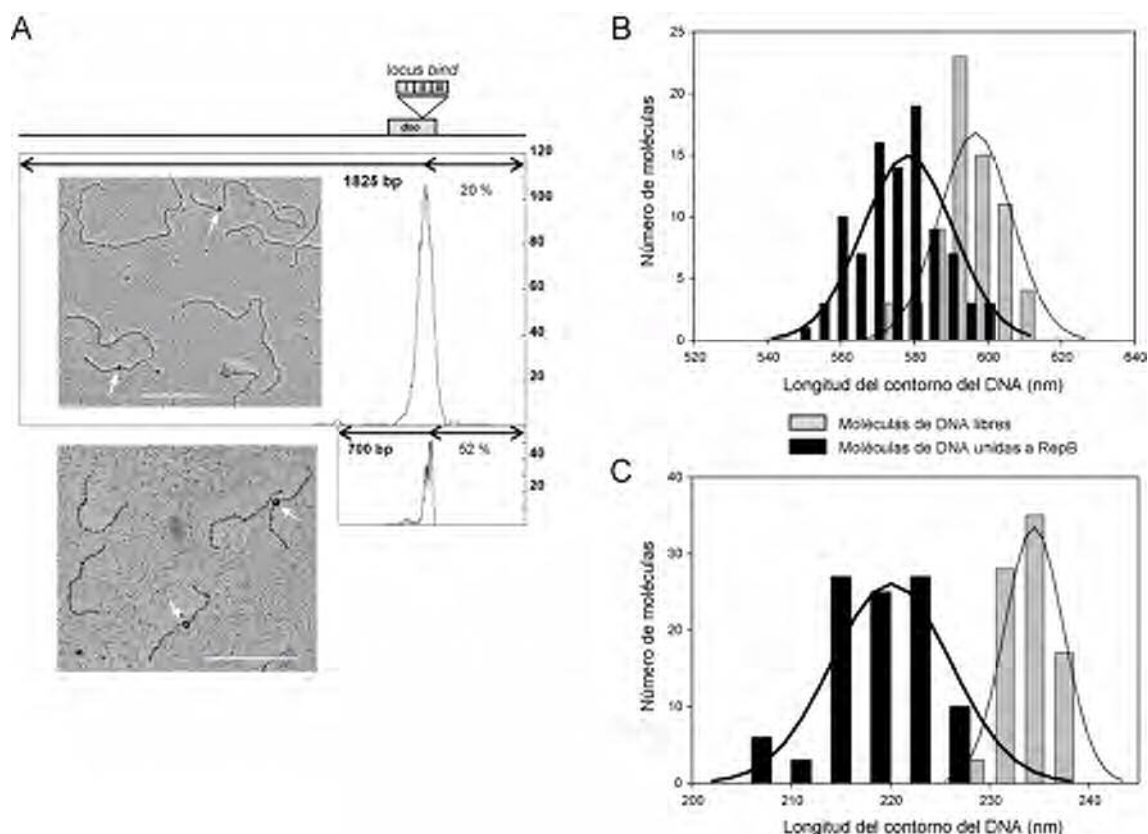


Figura 21. **Microscopía electrónica de los complejos RepB-DNA.** (A) Distribución de la localización de los complejos RepB-DNA desde uno de los extremos de los fragmentos de 1.825 pb y 700 pb. En el fragmento de 1.825 pb, RepB se localiza a un 20 % de la longitud total (es decir, a 365 pb) del extremo más cercano. En el fragmento de 700 pb, el locus *bind* está situado casi en el centro, por lo que la localización del complejo RepB-DNA presenta un pico de distribución asimétrico a un 52 % de la longitud total (365 pb) desde un extremo. En la parte superior del panel se muestra un esquema a escala de la posición del *dso* en el fragmento de 1.825 pb, con el inserto indicando la localización de las DDR. Más abajo se muestran micrografías de los fragmentos de DNA de 1.825 pb y 700 pb después de la incubación con RepB. Las flechas apuntan a RepB unida al locus *bind* del *dso*. En las micrografías, la barra de escala es de 200 nm (aproximadamente 600 pb). (B) y (C) Distribución de la longitud del contorno de las moléculas de DNA libres o unidas a RepB. Los histogramas muestran la distribución de la longitud del contorno de moléculas de DNA libres (barras grises) y unidas (barras negras) de 1.825 pb (B) y de 700 pb (C). La línea continua muestra el ajuste de la distribución a una curva de Gauss.

Una vez confirmada la especificidad de unión de RepB al locus *bind*, se midió el contorno de las moléculas de DNA de 1.825 y 700 pb, libres o unidas a RepB en la misma preparación (Figura 21 B y C; Tabla 8). Tras analizar un número de moléculas estadísticamente significativo ($n > 100$), pudimos observar una reducción en la longitud media del contorno de las moléculas de DNA tras la unión de RepB. Las gráficas que representan la distribución de las medidas de longitud de uno u otro DNA (Figura 21 B y C) muestran dos poblaciones diferentes: una de moléculas libres, y otra de moléculas unidas a RepB con una reducción del contorno. El acortamiento del DNA mediado por la unión de RepB se estimó en unos 50 pb (Figura 21 B y C; Tabla 8), lo cual es consistente con que la región del locus *bind* contactada por RepB esté enrollada en la proteína. En las imágenes de los complejos proteína-DNA, la longitud

del contorno de las moléculas se trazó siguiendo el recorrido más corto que describiría el DNA a su paso por la proteína. Por esta razón, aunque no podemos descartar que el DNA se enrolle alrededor de RepB, de manera similar a lo que ocurre en los nucleosomas, el acortamiento podría reflejar simplemente que el DNA del locus *bind* describe una trayectoria sinuosa a su paso por la proteína.

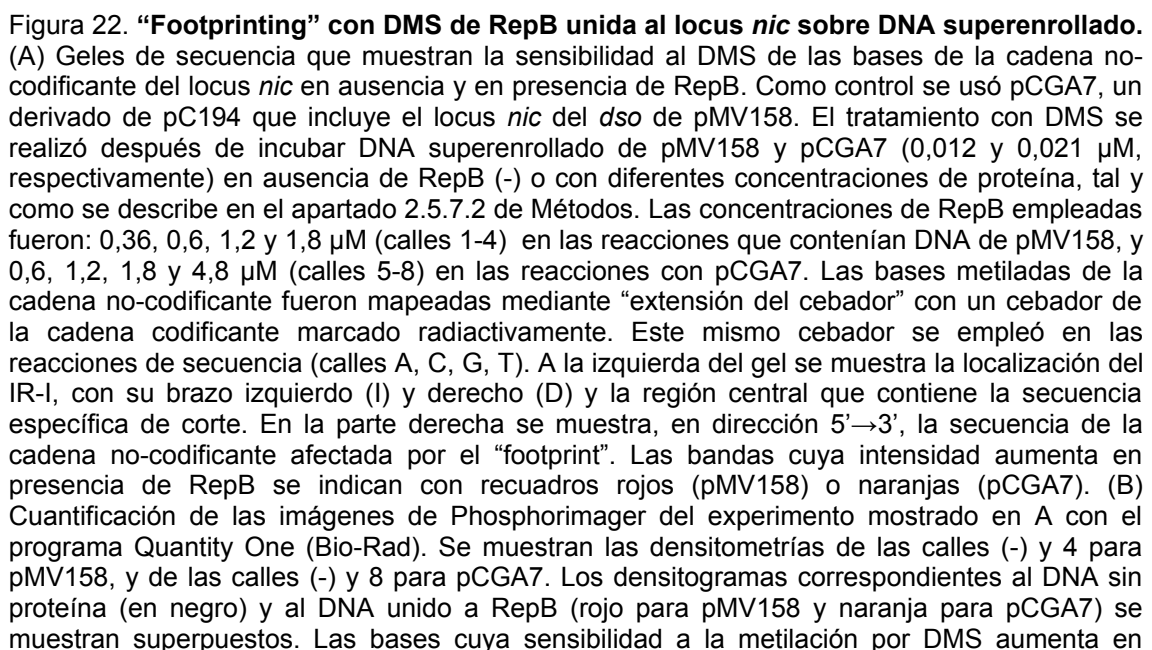
Tabla 8. Estadística de las medidas de la longitud del DNA

	1.825 pb	1.825 pb + RepB	700 pb	700 pb +RepB
Media (nm)	596,63	578,23	234,45	220,06
Desviación estándar	9,84	12,27	2,97	6,00
Error estándar	1,16	1,26	0,32	0,59

7. Análisis de las interacciones entre RepB y el dso en DNA plasmídico superenrollado.

Los resultados obtenidos con DNA superenrollado muestran que con relaciones molares proteína:DNA de hasta 30:1, los contactos de RepB con el DNA de pMV158 están restringidos al locus *bind* (Figura 17 C). En estas condiciones, no se observaron regiones sensibles a la oxidación por KMnO₄ (no se muestra), lo que indica la ausencia de DNA fuertemente distorsionado o incluso desapareado dentro del *dso*. Estos resultados excluyen la posibilidad de que la unión de RepB a su sitio primario, aunque acompañada de una fuerte distorsión del DNA del locus *bind*, contribuya a la extrusión de la estructura cruciforme IR-I del *dso* y, por tanto, al desapareamiento de la secuencia específica de corte.

Cuando aumentamos la concentración de RepB (relaciones molares proteína:DNA de 50:1 o mayores), además de los “footprints” debidos a la interacción de RepB con el locus *bind*, aparecieron nuevas bandas de hiperexposición al DMS en el locus *nic*. La aparición de estas bandas se observó al analizar el perfil de metilación de la cadena no-codificante en DNA superenrollado de pMV158. La intensidad relativa de las bandas hiperexpuestas se incrementó al aumentar la concentración de proteína, hasta alcanzar un plató a una relación RepB:DNA de 150:1 (Figura 22 C). Los residuos hipermetilados (en su mayoría Gs) estaban localizados en el brazo derecho de IR-I y en la región de DNA del espaciado de dicho elemento, que es complementaria a la secuencia de corte (Figura 22 A y B). Estos cambios pueden reflejar tanto la proximidad de RepB como cambios en la conformación del DNA debidos a la extrusión de la correspondiente estructura cruciforme. Como control, los experimentos de sensibilidad a DMS también se realizaron con DNA superenrollado del plásmido pCGA7, un derivado de pC194 que contiene el locus *nic* de pMV158 (incluyendo el elemento IR-I y las PDR) (del Solar *et al.*, 1993b; Moscoso *et al.*, 1995b). Los resultados mostraron que la presencia de RepB provocaba la hipermetilación de los mismos residuos que en pMV158, aunque en pCGA7 fue necesaria una mayor concentración de proteína para alcanzar niveles de reactividad al DMS similares a los



presencia de RepB se indican con barras rojas (pMV158) o naranjas (pCGA7). La altura de las barras es proporcional al aumento del porcentaje de sensibilidad a DMS. (C) Cuantificación del aumento de la metilación de las bases que tienen alterada su sensibilidad al DMS en el experimento mostrado en A para pMV158. En la gráfica se muestra el aumento del porcentaje de la metilación de cada base en las calles 1, 2, 3 y 4. Al aumentar la relación proteína:DNA por encima de 150:1 no se observó mayor exposición de las bases al DMS (no se muestra).

Para determinar si la interacción de la proteína iniciadora con el locus *nic* producía la fusión del DNA de esta región, se analizó la reactividad al KMnO_4 de la cadena no-codificante en los DNAs superenrollados de pMV158 y pCGA7 (Figura 23 A y B). Utilizamos el KMnO_4 debido a su capacidad de oxidar preferentemente timinas que se encuentran en regiones de DNA fuertemente distorsionadas, desnaturalizadas o que se localizan en el empalme con la doble cadena de DNA nativo (Schlax *et al.*, 1995). En pMV158, con relaciones molares proteína:DNA por encima de 50:1, se observó un aumento de la reactividad frente a KMnO_4 de dos timinas localizadas entre los dos brazos de IR-I, así como de tres bases (5'-TAT-3') adyacentes en sentido 5' al brazo derecho de IR-I (Figura 23 A y B). Aunque el aumento de la sensibilidad a KMnO_4 de las dos timinas de la región central del elemento IR-I sólo demuestra que el DNA de esta región se desaparece por unión de RepB, la extrusión de la estructura cruciforme de IR-I se podía deducir por el incremento de la reactividad de las tres bases (5'-TAT-3') contiguas al brazo derecho de dicho elemento (Figura 23 A y B). De hecho, la alteración del apilamiento de bases provocaría un aumento en la reactividad al KMnO_4 de los nucleótidos localizados en la unión entre dúplex de DNA inter- e intracatenarios de una estructura de tipo cruciforme (Figura 24).

Cuando analizamos el perfil de reactividad frente a KMnO_4 del DNA superenrollado de pCGA7 en ausencia de RepB, observamos la hiperexposición de las mismas timinas (dos en la región central de IR-I, y las dos de la secuencia 5'-TAT-3' contigua a dicho elemento) que en pMV158. La presencia de RepB no aumentó la exposición de estas bases a la oxidación por KMnO_4 , incluso a las concentraciones en las que la unión de RepB se podía deducir por la hipersensibilidad al DMS de los residuos G del tallo de la estructura cruciforme (Figura 22 A y B). De hecho, el perfil de sensibilidad a KMnO_4 del DNA superenrollado desnudo de pCGA7 coincide con el de pMV158 unido a RepB a la máxima concentración proteica usada. Estos resultados indicarían que la frecuencia de extrusión espontánea del cruciforme IR-I es mayor en pCGA7 que en pMV158, quizás debido a la ausencia en pCGA7 de posibles estructuras secundarias que compitan con el elemento IR-I en la relajación del estrés torsional del DNA superenrollado. El hecho de que la unión de RepB al DNA superenrollado de pCGA7 aumente la metilación de las Gs localizadas en el tallo de la estructura IR-I sin promover adicionalmente la extrusión del cruciforme, indicaría que la variación en el patrón de reactividad frente a DMS observada en ambos plásmidos procede de la proximidad de la proteína a las bases sensibles a la metilación y no de cualquier distorsión del DNA producida por RepB.

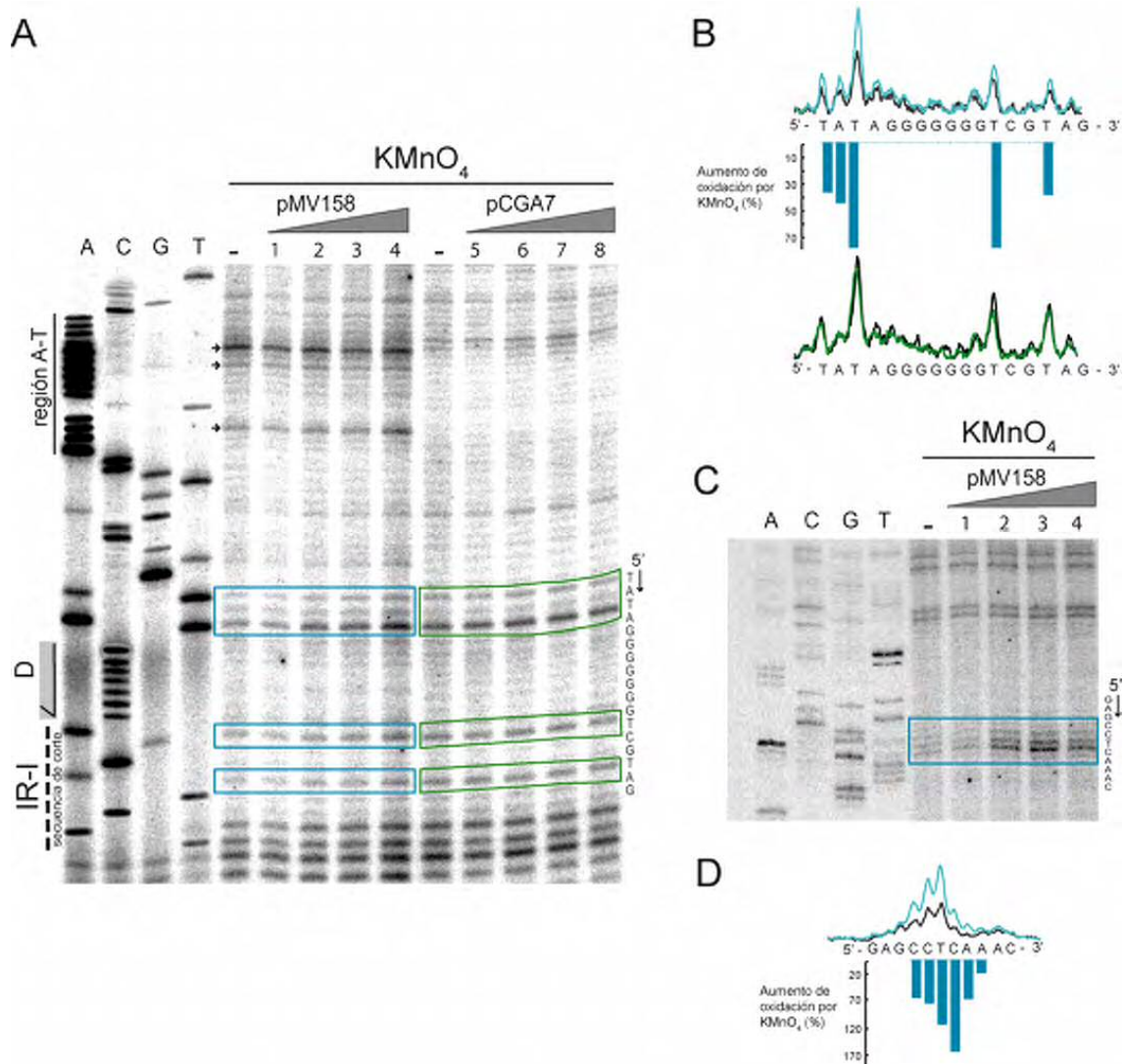


Figura 23. “Footprinting” con KMnO₄ de RepB unida al locus *nic* sobre DNA superenrollado. (A) Geles de secuencia que muestran la sensibilidad al DMS de las bases de la cadena no-codificante del locus *nic*, en ausencia y en presencia de RepB. Como control se usó pCGA7. El tratamiento con KMnO₄ se realizó después de incubar DNA superenrollado de pMV158 y pCGA7 (0,012 y 0,021 μ M, respectivamente) en ausencia de RepB (-) o con diferentes concentraciones de proteína, tal y como se describe en el apartado 2.5.7.2 de Métodos. Las concentraciones de RepB empleadas fueron: 0,6 μ M (calles 1 y 5), 1,8 μ M (calles 2 y 6), 2,4 μ M (calles 3 y 7) y 4,8 μ M (calles 4 y 8). Las bases modificadas de la cadena no-codificante fueron mapeadas mediante “extensión del cebador” con un cebador de la cadena codificante marcado radiactivamente. Este mismo cebador se empleó en las reacciones de secuencia (calles A, C, G, T). A la izquierda del gel se muestra la localización de IR-I, con su brazo derecho (D) y la región central, que contiene la secuencia específica de corte. A la derecha se muestra, en dirección 5'→3', la secuencia de la región de DNA distorsionada. Las bandas cuya intensidad aumenta en presencia de RepB se indican con recuadros azules en pMV158. Las mismas bandas se indican con recuadros verdes en pCGA7. Las flechas indican sitios donde existe una elevada reactividad al KMnO₄ independiente de RepB. (B) Cuantificación del experimento mostrado en A. Se muestran las densitometrías de las calles (-) y 4 para pMV158, y de las calles (-) y 8 para pCGA7. Los densitogramas correspondientes al DNA sin proteína (en negro) y al DNA unido a RepB (azul para pMV158 y verde para pCGA7) se muestran superpuestos. Las bases cuya sensibilidad a la oxidación por KMnO₄ aumenta en presencia de RepB se indican con barras azules (pMV158). La altura de las barras es proporcional al aumento del porcentaje de reactividad al KMnO₄. (C) Geles de secuencia que muestran la sensibilidad al DMS de las bases de la cadena no-codificante próximas al locus *bind*, en ausencia y en presencia de RepB. El DNA superenrollado de pMV158 (0,012 μ M) se

incubó sin RepB (-) o con diferentes concentraciones de proteína: 0,6, 1,8, 2,4 y 4,8 μM (calles 1-4, respectivamente). El tratamiento con KMnO_4 y el mapeado de las bases modificadas se realizó como se indica en A. Las reacciones de secuencia (calles A, C, G, T) se incluyeron como control. En la parte derecha se muestra, en dirección 5'→3', la secuencia de la región de DNA distorsionada tras la unión de RepB al locus *nic*. Las bandas cuya intensidad aumenta en presencia de RepB se indican con recuadros azules. (D) Cuantificación del experimento mostrado en C. Los densitogramas correspondientes al DNA sin proteína (en negro) y al DNA unido a RepB de la calle 4 (en azul) se muestran superpuestos. Las bases cuya sensibilidad a la oxidación por KMnO_4 aumenta en presencia de RepB se indican con barras azules. La altura de las barras es proporcional al aumento del porcentaje de reactividad al KMnO_4 .

Con todo, el cambio más notable en el patrón de reactividad al KMnO_4 del DNA superenrollado de pMV158 tras la unión de RepB, fue el aumento (de hasta un 150 %) de la oxidación de las bases de la secuencia 5'-CCTCAA-3' localizada a 11 pb del locus *bind*, en el DNA situado entre los loci *nic* y *bind* (Figura 23 C y D). Este hecho es indicativo de una fuerte distorsión o incluso desapareamiento de las bases del DNA próximo al locus *bind*, que sólo se observa a concentraciones de RepB a las que la proteína está unida a ambos loci.

Además de los sitios mencionados que presentaban un aumento en su sensibilidad al KMnO_4 debido a la unión de RepB al locus *nic*, existían varias timinas, localizadas en una región rica en pares A+T contigua a las PDR, que estaban hiperexpuestas al KMnO_4 en el DNA superenrollado desnudo de pMV158, y que no mostraban un aumento en su sensibilidad a este agente en presencia de la proteína (Figura 23 A). Estos resultados revelan que esta región rica en A+T, localizada entre las secuencias PDR y DDR, está fuertemente distorsionada en el DNA superenrollado de pMV158. Aunque esta secuencia también está presente en pCGA7, el grado de distorsión de esta región de pares A+T en el DNA superenrollado de este plásmido es mucho menor (Figura 23 A).

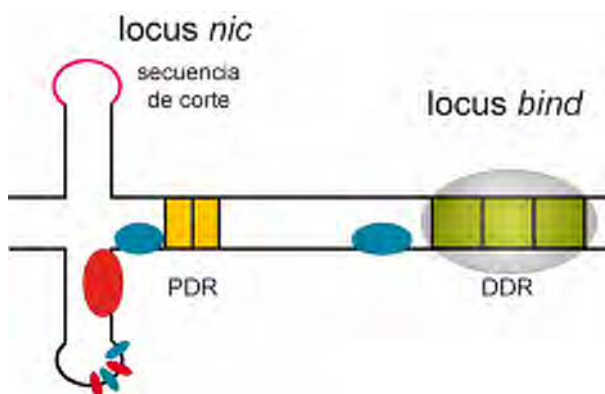


Figura 24. **Esquema donde se muestran las zonas de la cadena no-codificante del dso de pMV158 cuya sensibilidad al DMS o al KMnO_4 está modificada tras la unión de RepB al locus *nic*.** Una vez que RepB está unida a su sitio de alta afinidad en el locus *bind*, la proteína se uniría a su sitio de baja afinidad en el locus *nic*, generando algunas zonas donde aumenta la sensibilidad al DMS (elipses rojas) o al KMnO_4 (elipses azules). Aunque la mayoría de las zonas donde aumenta la sensibilidad al KMnO_4 se localizan al el locus *nic*, la región del dso más distorsionada se encuentra cerca de la secuencia DDR del locus *bind*. La estructura cruciforme IR-I se representa en el esquema, puesto que la unión de RepB al locus *nic* promueve su extrusión.

CAPÍTULO 2:

CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LA PROTEÍNA RepB INICIADORA DE LA REPLICACIÓN DEL PLÁSMIDO pMV158

1. Purificación de RepB a gran escala para estudios estructurales.

El plásmido pMV158 (5.536 pb) contiene varios genes distribuidos en tres casetes: (i) replicación y control; (ii) resistencia a tetraciclina, y (iii) movilización conjugativa (del Solar *et al.*, 1993a; Priebe and Lacks, 1989). La región de pMV158 que incluye los genes y los elementos implicados en la replicación de la cadena líder y el control del número de copias plasmídico es muy compacta, ya que sólo se extiende alrededor de 1 kb. Los genes *copG* y *repB* se co-transcriben desde un único promotor, denominado *P_{cr}*, y la proteína CopG autorregula la síntesis del mRNA *copG-repB* (del Solar *et al.*, 1995). Con el objetivo de purificar RepB a gran escala, eliminando cualquier posible influencia del control autorregulador ejercido por *copG*, clonamos sólo el gen *repB* junto con sus propias señales de traducción (fragmento repB entre las coordenadas 806 y 1.580 de pMV158) en el vector de expresión pGEM-T (Promega). En la nueva construcción, pGEMrepB1 (Figura 25 A), la expresión del gen *repB* quedaría bajo el control del promotor $\Phi 10$ del fago T7, que es reconocido específicamente por la RNA polimerasa de dicho fago. Tras seleccionar los clones que contenían el plásmido del tamaño esperado, determinamos, mediante el análisis del perfil de restricción del DNA plasmídico, la orientación relativa al vector del fragmento que contenía el gen *repB*. Posteriormente, comprobamos la secuencia de nucleótidos del DNA clonado en algunos de los plásmidos recombinantes con la orientación correcta, para descartar la existencia de mutaciones no deseadas. Finalmente, el plásmido pGEMrepB1 fue introducido en la estirpe de *E. coli* BL21(DE3). Esta estirpe contiene un profago defectivo de λ que incluye el gen de la RNA polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor inducible *lacUV5*.

El procedimiento para sobreproducir y purificar RepB, descrito en el apartado 2.1 de Métodos, se basa en el plásmido pGEMrepB1, y en la capacidad de RepB de precipitar selectivamente en condiciones de baja concentración de sal. Las modificaciones introducidas respecto al método anterior (de la Campa *et al.*, 1990) suponen una mejora en términos de nivel de expresión y un procedimiento más sencillo para escalar la purificación y aumentar el rendimiento final de la misma (unos 3 mg de proteína pura por cada litro de cultivo inducido). Una de las consecuencias derivadas del aumento de producción de RepB fue la pérdida de solubilidad de la proteína tras la lisis celular. La solución que adoptamos para evitar la formación de agregados insolubles de RepB consistió en aumentar la fuerza iónica del tampón de lisis, subiendo la concentración de KCl hasta 1 M. De esta manera conseguíamos más del 90 % de proteína soluble, pero inutilizábamos el siguiente paso de fraccionamiento con sulfato de estreptomicina. El sulfato de estreptomicina al 6 % es efectivo en la precipitación de ácidos nucleicos hasta una concentración máxima de 200 mM de KCl, por lo que necesitábamos una alternativa que funcionase a elevada concentración de sal. El compuesto elegido fue el polication sintético polietilenimina (PEI), que no sólo es capaz de precipitar ácidos nucleicos, sino también, y de manera selectiva, proteínas que unen DNA. Por esta razón, probamos un rango de concentración de PEI desde 0,1 hasta 0,5 % (v/v), y determinamos el contenido en ácidos nucleicos del sobrenadante obtenido después de centrifugar, analizando su espectro de absorción

en el UV. Por encima de 0,2 % (v/v) de PEI empezábamos a observar una pérdida considerable de proteína en general, por lo que decidimos utilizar esta concentración de policación. Para eliminar la PEI de la solución proteica obtenida tras la precipitación de los ácidos nucleicos, las proteínas presentes en el sobrenadante se precipitaron a su vez con sulfato amónico al 70 % de saturación. El sedimento de esta precipitación, que contenía casi la totalidad de proteína RepB, se resuspendió en tampón H suplementado con 1 M de KCl. Esta solución de proteínas se dializó frente al mismo tampón H pero sin suplementar con sal. La disminución de la fuerza iónica del tampón provoca la pérdida de solubilidad de RepB y, por tanto, su precipitación. Este paso es de gran importancia en todo el proceso, puesto que RepB precipita selectivamente y la mayoría de proteínas acompañantes pueden ser eliminadas en el sobrenadante de la centrifugación. El sedimento recogido después de la diálisis a baja fuerza iónica se disolvió en tampón H suplementado con 300 mM de KCl. El material insoluble en esta solución se eliminó por centrifugación tras comprobar que RepB se encontraba disuelta en estas condiciones. La purificación continuó con dos cromatografías de afinidad en columna de heparina-agarosa (Figura 25 B), de manera que, en la primera, se aplicó un gradiente separador, con el objetivo de conseguir una buena resolución proteica. Las fracciones con mayor pureza en RepB se juntaron y sometieron a una segunda cromatografía, en la que se aplicó un gradiente concentrador. Las fracciones elegidas de este segundo gradiente se juntaron y dializaron frente al tampón H con 1 M de KCl. Esta solución de proteína pura se concentró por filtración hasta alcanzar una concentración de entre 10 y 20 mg/ml.

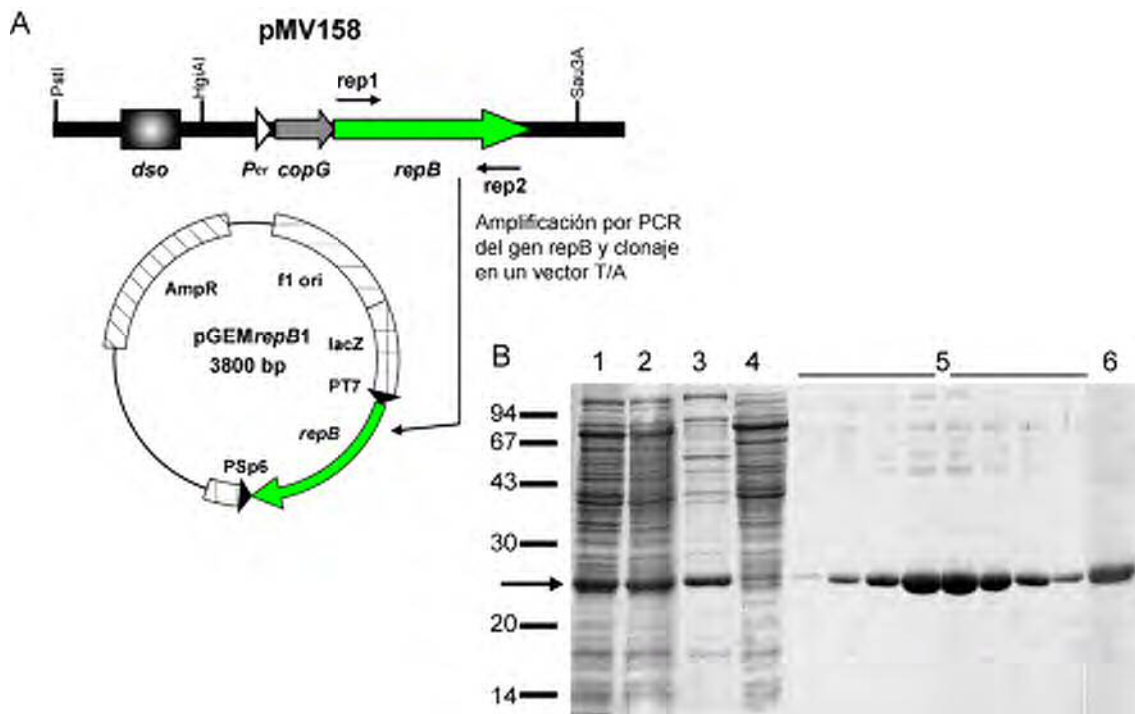


Figura 25. **Características de la región de replicación y control de pMV158 y construcción de un plásmido para la purificación de RepB.** (A) Representación esquemática de la región de pMV158 implicada en la replicación y el control de la cadena líder. El iniciador de la replicación, RepB, es el efector positivo que actúa sobre el origen de replicación de doble

cadena (*dso*). Desde el promotor P_{cr} (triángulo blanco) se co-transcriben los genes *repB* y *copG* (este último codifica un represor transcripcional del promotor P_{cr}). Para construir el plásmido de expresión pGEMrepB1, amplificamos por PCR, con los oligos rep1 y rep2, la región de pMV158 que contiene el gen *repB*, y el fragmento resultante lo introdujimos en el vector pGEM-T. En esta construcción la expresión de *repB* está controlada por el promotor $\Phi 10$ reconocido por la RNA polimerasa del fago T7. Los triángulos negros indican promotores reconocidos por las RNA polimerasas de los fagos T7 y SP6. (B) Purificación de RepB. Se muestra el análisis de diferentes etapas de la purificación mediante electroforesis en geles de PAA al 12 % con SDS. En el gel se aplicaron las siguientes fracciones del volumen total de la muestra: 0,05 % del sobrenadante de PEI (calle 1), 0,05 % del precipitado con sulfato amónico (calle 2), 0,05 % de la parte insoluble (calle 3) y soluble (calle 4) a baja concentración de sal, 2,5 % de las fracciones del pico del primer gradiente en la columna de heparina-agarosa (calles del grupo 5), y 0,03 % de la preparación de proteína RepB purificada tras el paso de concentración (calle 6). En la parte izquierda del gel se indica la posición de las bandas del marcador de peso molecular empleado, así como la posición de RepB (flecha).

El análisis, mediante electroforesis en geles de PAA/SDS, de la solución de proteína concentrada, mostró que la pureza de la preparación de RepB era mayor de un 95 % (Figura 25 B). La determinación de la secuencia del extremo amino de RepB mostró que el residuo Met1 está eliminado en la proteína purificada, por lo que la masa molecular del producto procesado es de 24.121 Da. El resultado del análisis de aminoácidos de RepB coincidió con la composición de aminoácidos predicha a partir de la secuencia de nucleótidos del gen *repB* (no se muestra). Su coeficiente de extinción molar a 280 nm es de $24.850 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, debido a la presencia de 1 Trp, 13 Tyr y 8 Phe, que representan alrededor de un 10 % del contenido total de aminoácidos de la proteína. Además, el contenido en aminoácidos básicos (entre los que hay 25 Lys) es relativamente alto, lo que da lugar a un punto isoeléctrico básico (8,75), que es frecuente en proteínas que unen DNA.

2. RepB es un hexámero de subunidades idénticas: análisis de las propiedades hidrodinámicas de RepB mediante velocidad y equilibrio de sedimentación.

Los ensayos de equilibrio de sedimentación se realizaron con diferentes concentraciones de RepB (desde 1 hasta 40 μM), y a todas ellas se obtuvo un perfil de sedimentación similar. Con una concentración 4 μM de RepB, los datos experimentales (Figura 26) presentan el mejor ajuste a una masa molecular promedio ($M_{w,a}$) de 144.000 ± 3.000 , un valor que corresponde con la masa molecular teórica de un hexámero de RepB (144.726 Da). Con concentraciones de RepB de 1 y 10 μM se obtuvieron valores similares de la masa molecular promedio (138.000 y 140.000, respectivamente). Sin embargo, al aumentar la concentración de RepB a 25 y 40 μM se observó la aparición de especies moleculares de mayor tamaño, que contribuían al aumento del valor de $M_{w,a}$ (183.000 y 190.000, respectivamente). Esto supone una indicación de la tendencia que presenta RepB para formar agregados de proteína de mayor orden que el hexámero, cuya significación biológica se discutirá en esta tesis.

El perfil de velocidad de sedimentación de RepB a 4 μM (insertado en Figura 26) se ajusta bien a la sedimentación de una única especie, con un coeficiente de sedimentación $S_{20,w}$ de $6,83 \pm 0,1 \text{ S}$ y un valor $M_{w,a}$ de 140.000 que corresponde con el obtenido en los ensayos de equilibrio de sedimentación y con la masa teórica del

hexámero de RepB. No se observó ninguna mejora en los parámetros de ajuste al considerar la sedimentación de más de una especie, lo que se considera un buen indicador de la homogeneidad de la muestra. El coeficiente de fricción (f) obtenido en los ensayos de ultracentrifugación analítica (UA) fue $1,33 \pm 0,1$. Por tanto, el comportamiento hidrodinámico del hexámero de RepB es diferente del que correspondería a una partícula esférica rígida.

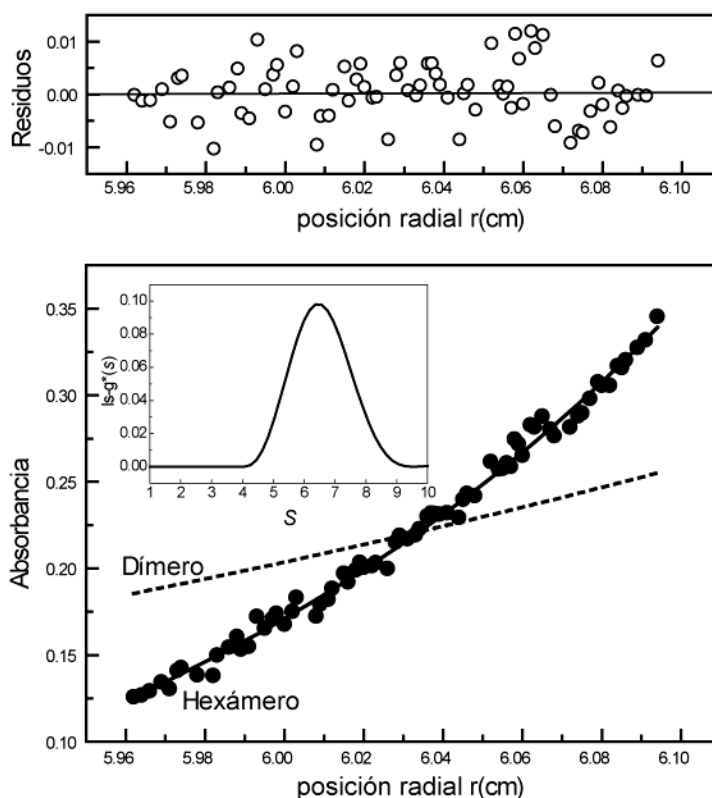


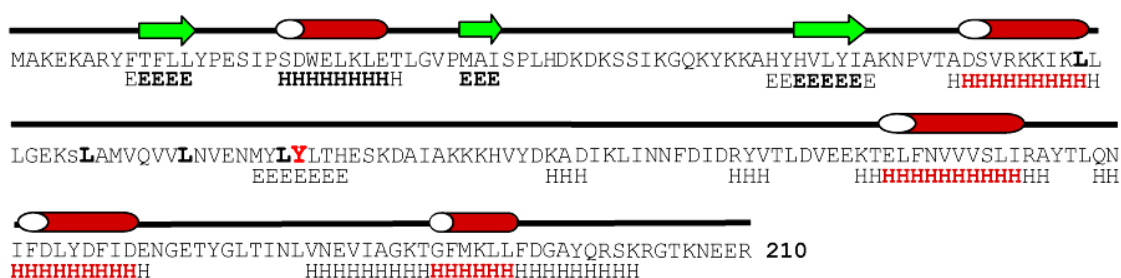
Figura 26. **Perfil de ultracentrifugación analítica de RepB.** En la figura se muestra el gradiente de RepB por equilibrio de sedimentación ($4 \mu\text{M}$ en tampón UA) a 8.000 rpm y 20°C . Los círculos negros representan los datos experimentales; la línea continua es el mejor ajuste M_w (144.000 ± 3.000); y la línea discontinua es el gradiente teórico de un dímero de RepB (48.500). Inserto: distribución de velocidad de sedimentación (45.000 rpm a 20°C) de la misma RepB que se muestra en la figura principal.

3. Estructura secundaria de RepB.

Para determinar la estructura secundaria de RepB empleamos dos técnicas diferentes: métodos computacionales y análisis de espectroscopía de dicroísmo circular (DC). Los resultados obtenidos con ambas técnicas coincidieron en la estimación del contenido de estructura secundaria de RepB. La estimación obtenida con las herramientas bioinformáticas (PHD, PROF y PSIPRED) fue bastante consistente con unos valores de 40-46 % de hélices α , 12-15 % de cadenas β , y 42-46 % de otras estructuras. La distribución de la predicción de elementos de estructura secundaria sobre la secuencia de aminoácidos (Figura 27 A) muestra la alternancia de cadenas β con hélices α en la mitad N-terminal de la proteína, mientras que la mitad

C-terminal contiene mayoritariamente segmentos de hélice α . El análisis de la secuencia de RepB con el programa “PROSITE motif search” predice la existencia de un motivo de “cremallera de leucinas” entre los residuos 77 y 98 (Figura 27 A), justo antes del residuo Tyr99 implicado en la reacción de corte (Moscoso *et al.*, 1997), aunque la predicción para esta región es que no es especialmente rica en hélices α . Tampoco fue posible encontrar en la secuencia de RepB ninguno de los motivos de unión a DNA típicos, como el motivo hélice-giro-hélice o el motivo “ribbon”-hélice-hélice. En comparación, el dominio de unión a DNA y de especificidad de origen de la proteína RepC iniciadora de la replicación del plásmido pT181 está localizado en el extremo carboxilo, donde tampoco se han encontrado ninguno de los motivos típicos de unión a DNA (Dempsey *et al.*, 1992b; Wang *et al.*, 1992).

A



B

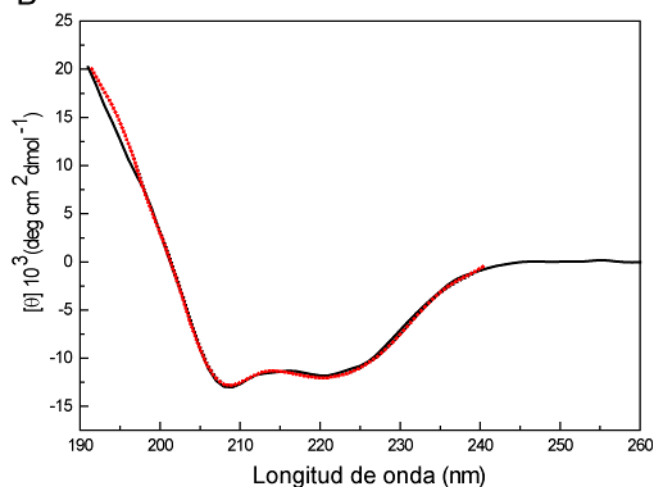


Figura 27. **Análisis de la estructura secundaria de RepB.** (A) Análisis por métodos computacionales. Los elementos de estructura secundaria se muestran en relación con la secuencia de aminoácidos de RepB. Los símbolos y letras que aparecen encima y debajo, respectivamente, de la secuencia de RepB corresponden a hélices α (H y cilindros) y cadenas β (E y cintas en forma de flecha). Las letras en negrita indican la predicción consenso entre los métodos utilizados. En la secuencia también se indica en rojo el residuo de Tyr (Y) implicado en la actividad de corte, y en negritas los residuos Leu (L) del supuesto motivo de “cremallera de leucinas”. (B) Espectro de dicroísmo circular de RepB en el UV lejano (línea negra). Antes de la adquisición del espectro, la solución de RepB (30 μ M) se equilibró por diálisis en tampón CD. El espectro se caracteriza por la presencia de dos mínimos a 208 y 222 nm, y un máximo alrededor de 192 nm. La línea roja representa el ajuste de los valores experimentales por el método utilizado en el programa CONTIN/LL a 20 °C. Los datos experimentales se adquirieron en cubetas de 0.1 mm de paso óptico.

El espectro de DC de RepB en la región lejana del UV (180-240 nm) está caracterizado por la presencia de dos mínimos a 208 y 222 nm y un máximo alrededor de 192 nm, indicativos de la presencia de hélices α (Figura 27 B). La composición de estructura secundaria total de RepB fue estimada por cuatro métodos de deconvolución del espectro de DC (véase el apartado 2.7.1 de Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos con los cuatro métodos fueron muy similares, con unos valores medios de $33 (\pm 3) \%$ de hélices α , $20 (\pm 4) \%$ de cadenas β , y un $47 (\pm 5) \%$ asignado a giros u otras estructuras no regulares.

4. Medida de la estabilidad térmica de RepB por espectroscopía de DC.

Los cambios en la estructura secundaria de RepB inducidos por el aumento de la temperatura fueron analizados por DC en el UV lejano. La curva de desnaturalización térmica de RepB refleja los cambios en la elipticidad a 218 nm debidos al aumento de la temperatura desde 25 °C a 95 °C (Figura 28 A). Se observaron dos cambios significativos: el primero tiene lugar entre 32 y 45 °C (insertado Figura 28 A), y el segundo sucede por encima de los 75 °C y coincide con la pérdida de señal de dicroísmo debido a la precipitación de la proteína.

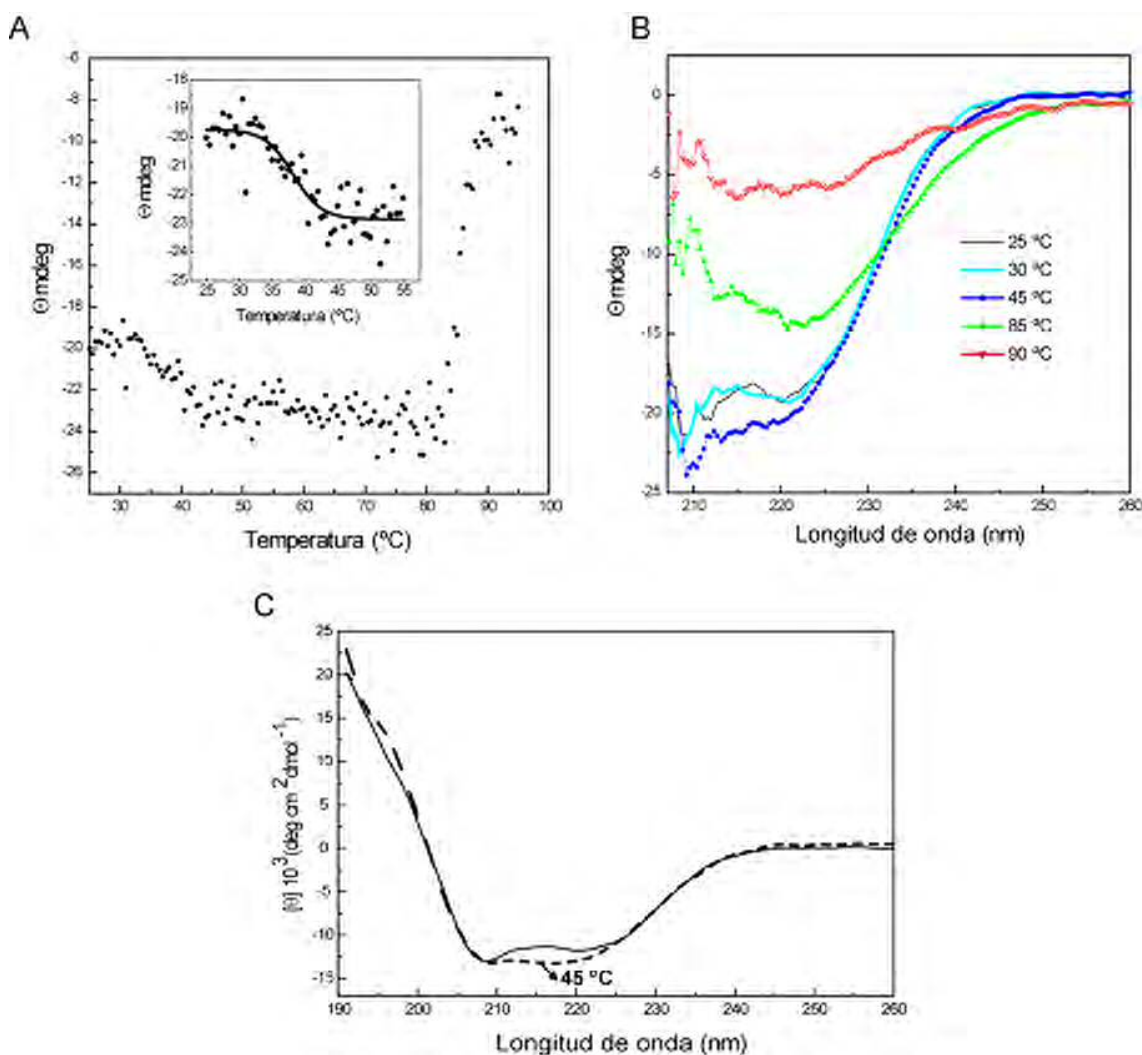


Figura 28. **Análisis de la estabilidad térmica de RepB.** (A) Cambios en la estructura secundaria de RepB asociados al incremento de la temperatura, analizados por DC en el UV lejano. Se muestra la curva de transición térmica del dicroísmo de RepB a 218 nm. En el inserto se muestra una ampliación de la curva entre 25 y 55 °C. La línea continua representa el mejor ajuste de los datos experimentales a un modelo de dos estados. (B) Espectros de DC de RepB en el UV lejano a las temperaturas indicadas. Se emplearon cubetas de 1 mm de paso óptico. (C) Espectro de DC de RepB a 20 °C (línea continua) o a 45 °C (línea discontinua), adquirido en cubetas de 0.1 mm de paso óptico.

Los espectros de DC recogidos a diferentes temperaturas mostraron un pequeño aumento (12-15 %) en la elipticidad al pasar de 30 a 45 °C (Figura 28 B). Al analizar el espectro de DC de RepB a 45 °C (recogido entre 190 y 260 nm; Figura 28 C) por tres métodos diferentes, observamos un pequeño, pero consistente, aumento (alrededor de un 5 %) en el contenido total de hélices α . Este cambio en la estructura secundaria de RepB se caracteriza por ser irreversible e independiente tanto de la concentración de RepB (en un rango de 8 a 40 μ M; no se muestra), como de la velocidad de incremento de la temperatura (15, 45 y 60 °C; no se muestra).

La alteración de la estructura de RepB asociada a un aumento de la temperatura también fue analizada por DC en el UV cercano (240-320 nm). Los espectros de DC en el UV cercano son útiles para detectar cambios en la estructura terciaria. En proteínas, la señal de dicroísmo en el UV cercano se observa cuando las cadenas laterales de los residuos aromáticos están inmovilizadas en la proteína plegada y, por tanto, transferidas a un ambiente asimétrico. El sentido y la magnitud del dicroísmo de los cromóforos aromáticos no se pueden predecir, y dependen casi exclusivamente de su entorno. Por tanto, el espectro de DC en el UV cercano de una proteína constituye un indicador muy sensible de su estado nativo. El espectro de DC en el UV cercano de RepB a 25 °C se caracteriza por un mínimo a 280 nm y un máximo a 250 nm (Figura 29 B). Debido al contenido de residuos aromáticos de RepB (1 Trp, 13 Tyr y 8 Phe), es difícil asignar a un cromóforo determinado el espectro de DC para la proteína. La curva de desnaturalización térmica de RepB en el UV cercano refleja los cambios en la elipticidad a 282 nm relacionados con el incremento de temperatura desde 20 a 60 °C (Figura 29 A). Se observa un cambio en el mismo rango de temperatura (entre 32 y 45 °C) en el que se produce la alteración del espectro de DC en el UV lejano (Figuras 29 A y 28 A). Por encima de 75 °C la proteína precipita y, al igual que en el UV lejano, se produce una pérdida de la señal de dicroísmo (no se muestra). Los espectros de DC en el UV cercano (Figura 29 B), adquiridos entre 250 y 320 nm, muestran una reducción de más de un 75 % del valor de elipticidad a 282 nm, indicativo de un cambio en la estructura terciaria del entorno de los cromóforos aromáticos.

Con el fin de comparar la transición térmica entre 32 y 45 °C observada por DC tanto en el UV lejano como en el UV cercano, se realizó un ajuste de los datos experimentales a un modelo de dos estados. Al representar los valores normalizados frente a la temperatura (Figura 30), se observa que ambas curvas coinciden, lo que indica que el mismo cambio conformacional afecta a la estructura secundaria y terciaria de RepB.

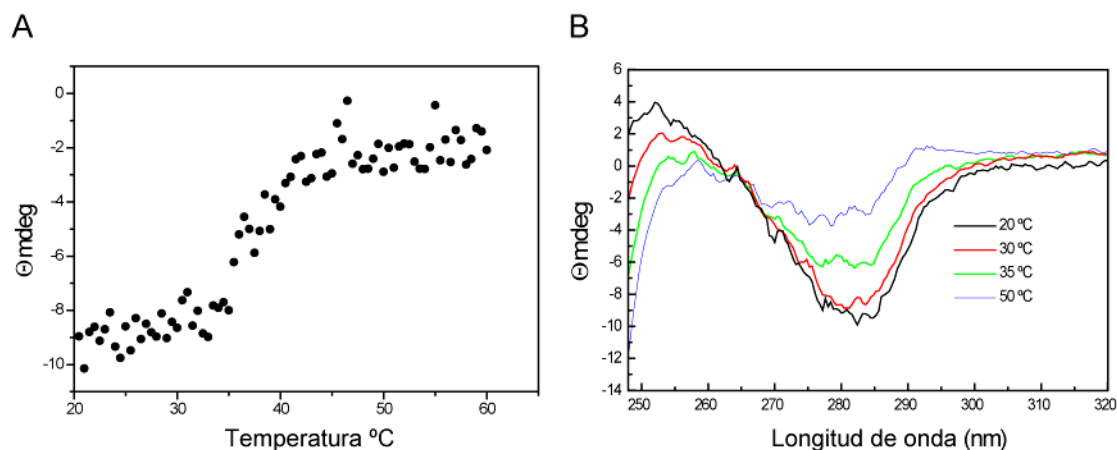


Figura 29. **Cambios en la estructura terciaria de RepB asociados a un aumento de la temperatura.** Los cambios, inducidos por la temperatura, en la conformación del entorno de los residuos aromáticos de RepB se analizaron en el rango de temperaturas de 20 a 60 °C mediante el seguimiento de la elipticidad a 282 nm y del espectro de RepB en el UV cercano. (A) Curva de transición térmica de RepB analizada por dicroísmo a 282 nm. (B) Espectros de DC de RepB en el UV cercano a las temperaturas indicadas.

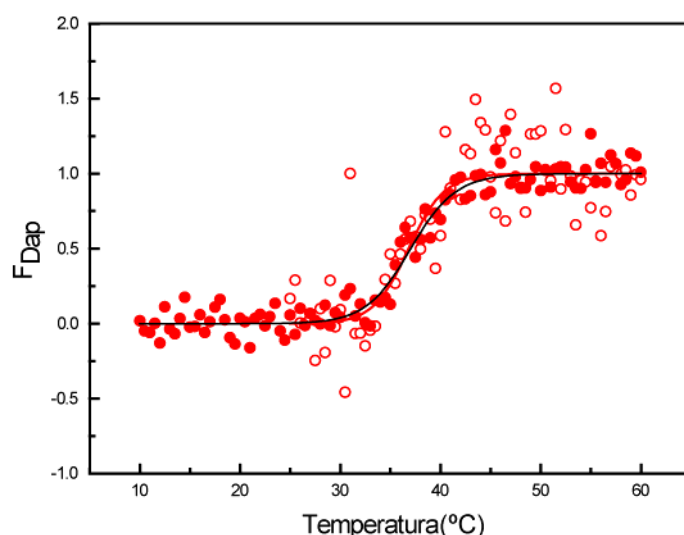


Figura 30. **Curvas de transición térmica generadas por la variación de la elipticidad a 218 nm (●) y a 282 nm (○) en el rango de temperaturas indicado.** Los datos experimentales se ajustaron a un modelo de dos estados. F_{Dap} representa la fracción de RepB en el estado de conformación inducido por el aumento de la temperatura. Las líneas continuas negra y roja representan el mejor ajuste a un modelo de dos estados de los datos experimentales a 218 nm y 282 nm, respectivamente. La coincidencia de las curvas de transición indica que el mismo cambio conformacional afecta tanto a la estructura secundaria como a la estructura terciaria de RepB.

Para determinar si el cambio estructural objeto de nuestro análisis suponía también una alteración del estado de oligomerización de RepB, determinamos la masa molecular promedio de la proteína en diferentes puntos de la curva de desnaturalización térmica, mediante equilibrio de sedimentación por UA. La realización de este experimento fue posible gracias a la naturaleza irreversible del cambio estructural sufrido por RepB. Los resultados (Figura 31) sugieren que la transición

térmica entre 32 y 45 °C desencadena una serie de cambios en el estado de asociación de la proteína, que pasa progresivamente de una masa molecular promedio de 144.000 (correspondiente a un hexámero) a 30 °C, a un promedio de 317.000 a 55 °C, hasta alcanzar un valor de 665.000 a 75 °C, justo antes de precipitar.

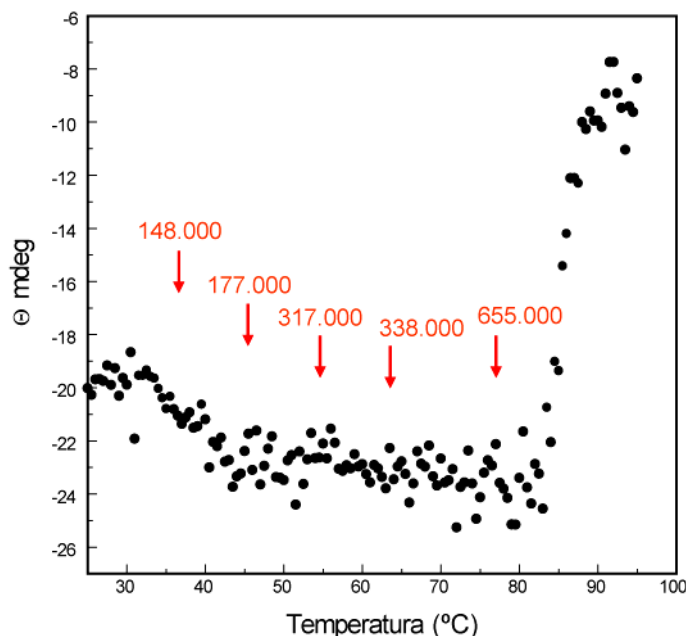


Figura 31. **Determinación de la masa molecular de RepB después del calentamiento a diferentes temperaturas.** En la figura se muestran los cambios de conformación de RepB inducidos por el aumento de la temperatura que fueron monitorizados por la variación de la elipticidad a 218 nm. Las muestras calentadas a diferentes temperaturas (flechas rojas) se analizaron por ultracentrifugación analítica mediante equilibrio de sedimentación. La masa molecular promedio (números en rojo) de RepB a cada temperatura se indica sobre su curva de desnaturalización térmica.

5. El Mn^{2+} es esencial para la actividad catalítica de RepB y protege a la proteína de la inactivación térmica.

La proteína RepB purificada es capaz de relajar el DNA superenrollado (SC) de pMV158. Como productos de reacción de la actividad de RepB se observan dos tipos de moléculas: círculos abiertos (OC) y círculos relajados y cerrados (Rel). Las moléculas OC se producen tras un evento de corte, mientras que la generación de moléculas Rel se debe a la actividad de transferencia de cadena (corte y cierre) de RepB. La caracterización inicial de la actividad de corte y corte/cierre de RepB mostró que la conversión progresiva de formas SC en formas OC y Rel es dependiente de la temperatura (Moscoso *et al.*, 1995a). Los experimentos de cinética mostraron que la conversión de DNA plasmídico SC a las formas OC y Rel es muy rápida a 60 °C, aunque el proceso se ralentiza al disminuir la temperatura (Moscoso *et al.*, 1995a).

Además de la temperatura de la reacción, la actividad de corte de RepB depende de la presencia de un catión divalente. Los ensayos previos realizados en el laboratorio mostraron que la actividad de RepB sobre DNA SC era dependiente de Mn^{2+} (de la Campa *et al.*, 1990). Para analizar con más detalle el requerimiento de

este catión para la actividad de RepB sobre DNA SC de pMV158, realizamos los ensayos de actividad a 37 y 60 °C con diferentes concentraciones de Mn^{2+} . Los resultados mostraron no sólo una dependencia de la temperatura, sino también de la concentración de Mn^{2+} (Figura 32 A). Ni a 37 °C ni a 60 °C se observó actividad a concentraciones inferiores a 5 mM de $MnCl_2$, aunque la dependencia de una elevada concentración de Mn^{2+} es más notable a 37 °C (Figura 32 A). La actividad de RepB sobre DNA plasmídico SC también se probó con otros cationes metálicos divalentes como Mg^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , y ninguno de ellos fue capaz de complementar la ausencia de Mn^{2+} . Sólo con Co^{2+} se observó actividad de corte/cierre, aunque a niveles menores que con Mn^{2+} (Figura 32 B).

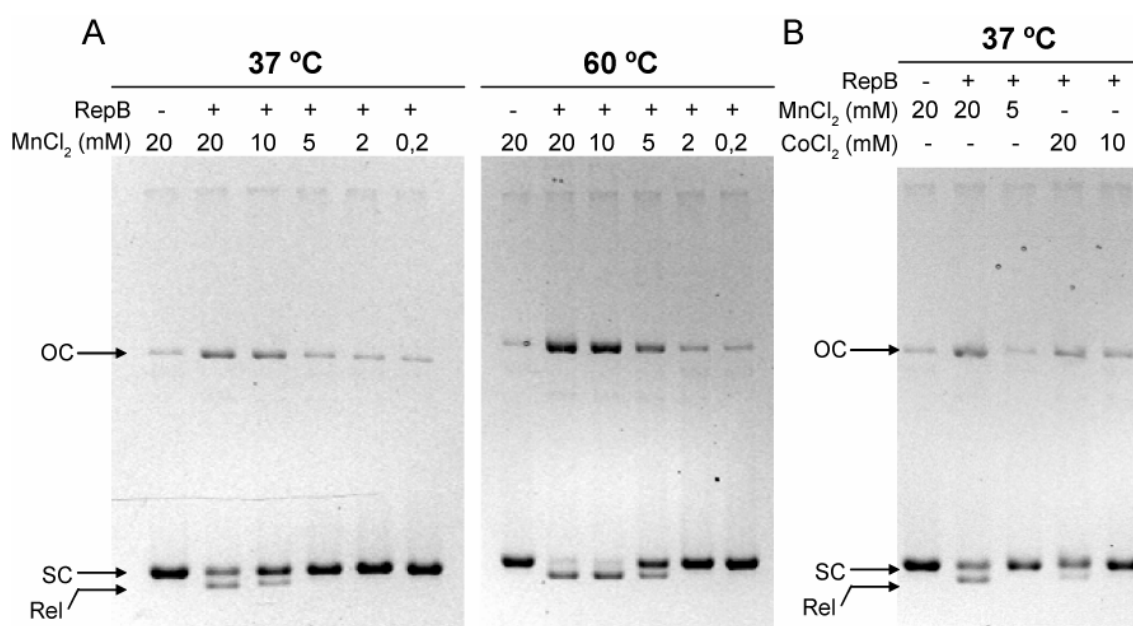


Figura 32. **Ensayos de actividad de corte y corte/cierre de RepB sobre DNA SC de pMV158.** (A) En estos experimentos se incubó DNA SC de pMV158 (0,5 µg; 0,15 pmoles), a 37 °C o a 60 °C, con la concentración indicada de $MnCl_2$, en ausencia (-) o en presencia (+) de RepB purificada (100 ng; 4 pmoles). En la figura se indica la posición del DNA plasmídico superenrollado (SC), circular cerrado (Rel), y circular abierto (OC). (B) En este experimento se muestra la actividad de RepB a 37 °C en presencia de $CoCl_2$, en comparación con la actividad de la misma preparación de proteína con $MnCl_2$. Se indica la posición de las distintas formas plasmídicas igual que en A.

La elevada temperatura óptima de la actividad de RepB sobre DNA plasmídico SC (60 °C), podría estar relacionada con el cambio estructural que sufre la proteína en un rango de temperaturas (32-45 °C) que incluye la temperatura fisiológica de crecimiento (37 °C) de *S. pneumoniae*, huésped de pMV158. Para resolver esta cuestión, decidimos analizar la actividad sobre DNA SC de pMV158 de una muestra de RepB a la que se le provocó el cambio conformacional por calentamiento a 45 °C (Figura 33). Como control, analizamos la actividad de una alícuota de RepB sin calentar. Los resultados mostraron que el cambio estructural no supone una activación de la proteína, sino que, al contrario, provoca una pérdida de la actividad catalítica de RepB (Figura 33 A). Además, mediante experimentos de EMSA pudimos determinar

que el cambio estructural también supone una pérdida de la actividad de unión al DNA del locus *bind* (Figura 33 B). Por tanto, estos resultados contrastan con lo esperado y descartan cualquier relación entre el cambio estructural inducido por la temperatura (entre 32 y 45 °C) y el óptimo de actividad de RepB sobre DNA SC a 60 °C.

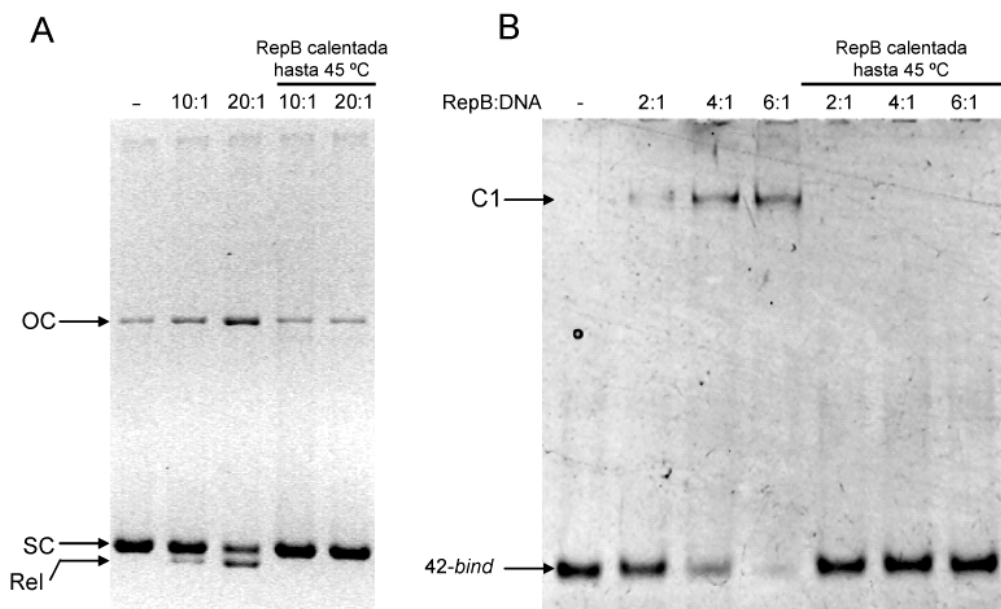


Figura 33. **Inactivación de RepB por calentamiento a 45 °C.** (A) Actividad de corte de RepB antes y después del calentamiento a 45 °C. Las preparaciones de proteína calentada a 45 °C o sin calentar se mezclaron con DNA SC de pMV158 (16 nM) en la relación molar indicada, y se incubaron a 37 °C en presencia de 20 mM de $MnCl_2$. La posición del sustrato y de los productos de reacción se indica en el gel: plásmido superenrollado (SC), DNA plasmídico cerrado y relajado (Rel), y DNA plasmídico circular abierto (OC). (B) Actividad de unión a DNA de RepB antes y después del calentamiento a 45 °C. Se realizaron ensayos de retardo en gel en los que las preparaciones de proteína calentada a 45 °C o sin calentar se mezclaron, en la relación molar indicada, con el fragmento 42-*bind* (400 nM), que contiene las repeticiones directas que constituyen el locus *bind*. La presencia de los complejos RepB-DNA se analizó por electroforesis en geles nativos de PAA al 5 %. En la figura se indica la posición del DNA libre (42-*bind*) y del complejo C1 RepB-42-*bind*.

Dado que los ensayos de actividad sobre DNA plasmídico SC, que evidenciaban una elevada temperatura óptima para la reacción mediada por RepB, se realizaron en presencia de 20 mM de $MnCl_2$, cabía suponer que el metal divalente tuviera algún efecto protector frente a la inactivación térmica de RepB. Para estudiar las características de este posible efecto estabilizador de los metales, analizamos, mediante DC en el UV lejano, el efecto del Mn^{2+} en los cambios estructurales de la proteína. La presencia de Mn^{2+} en la preparación de proteína no alteró el espectro de DC de RepB en el UV lejano (no se muestra). Sin embargo, las curvas de desnaturalización térmica de RepB, generadas por la variación de la elipticidad a 218 nm entre 20 y 90 °C, mostraron que concentraciones de $MnCl_2$ en el rango de 1 a 20 mM son capaces de aumentar en unos 25 °C la temperatura media a la que sucede la primera transición térmica de RepB (Figura 34 A). La segunda transición térmica, que supone la precipitación de la proteína, no está afectada por la presencia de $MnCl_2$. Al analizar la muestra de proteína RepB calentada a 45 °C en presencia de $MnCl_2$

podimos observar que conserva intacta su actividad de corte y corte/cierre sobre DNA plasmídico SC (Figura 34 B). RepB requiere un sustrato de DNA monocatenario para ejercer su actividad de corte (Moscoso *et al.*, 1995a). Este requisito se cumple en DNA plasmídico SC, donde la extrusión de la repetición invertida IR-I sitúa la secuencia de corte en la región desapareada de una estructura del tipo tallo-lazo. Dado que la formación de este tipo de estructuras está facilitada por un aumento de la temperatura (Bowater *et al.*, 1991), es posible que sólo una fracción de DNA plasmídico tenga el lazo de IR-I expuesto, y que esta fracción aumente al subir la temperatura de la reacción. Por tanto, la actividad óptima de RepB a 60 °C estaría relacionada tanto con la conservación de su actividad sobre DNA plasmídico en presencia de Mn^{2+} , como con la existencia de un mayor número de moléculas con el sitio de corte expuesto en configuración monocatenaria. Por último, la capacidad de “retrasar” la primera transición térmica de RepB también se probó con otros cationes divalentes. La presencia de 20 mM de $CoCl_2$, que proporciona ciertos niveles de actividad sobre DNA SC, aumenta en unos 30 °C la temperatura media de desnaturalización (Figura 34 A). Otros metales como el Mg^{2+} o el Ca^{2+} , en cuya presencia RepB no muestra actividad catalítica, no son capaces de “retrasar” la desnaturalización térmica de RepB (no se muestra).

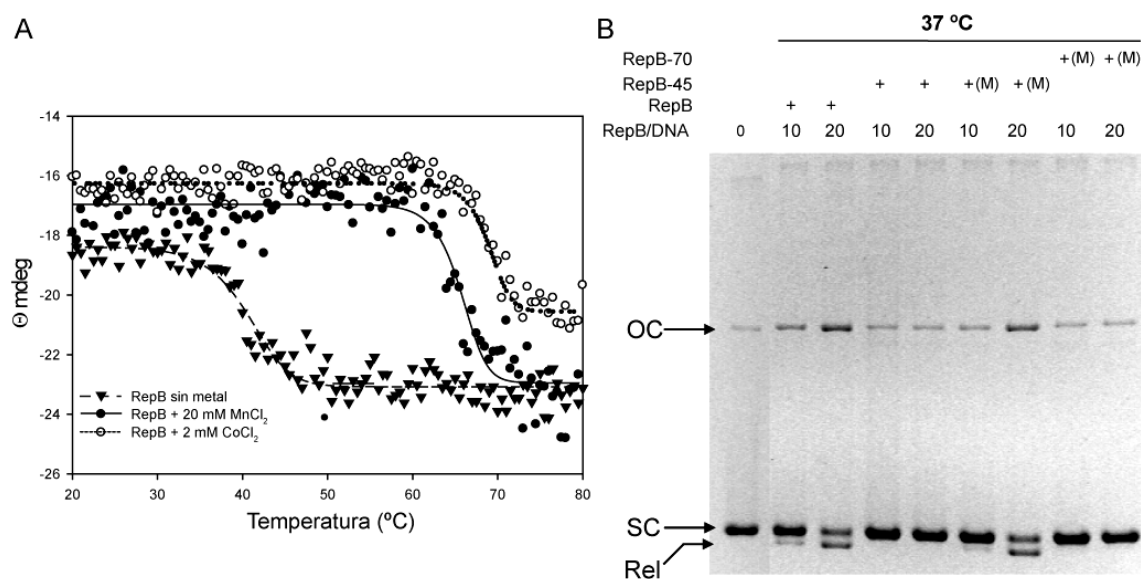


Figura 34. (A) **Análisis de la estabilidad térmica de RepB en presencia de metales divalentes.** En la figura se muestran las curvas de transición térmica generadas por la variación de la elipticidad a 218 nm, en el rango de temperaturas indicado, en ausencia de metal (\blacktriangledown), o en presencia de 20 mM de $MnCl_2$ (\bullet) o de 2 mM de $CoCl_2$ (\circ). En todos los casos, la línea representa el mejor ajuste de los datos experimentales a un modelo de dos estados. (B) **Protección mediada por Mn^{2+} frente a la inactivación térmica de RepB.** En estos experimentos se determinó la actividad de corte y corte/cierre sobre DNA SC de varias muestras de RepB que habían sido calentadas en diferentes condiciones. En las reacciones de corte se incubó DNA superenrollado de pMV158 (0,5 μ g; 0,15 pmoles) con RepB a 37 °C durante 30 min, en presencia de 20 mM de $MnCl_2$, a las relaciones molares proteína:DNA indicadas. Las distintas formas plasmídicas: DNA superenrollado (SC), DNA cerrado y relajado (Rel), y DNA circular abierto (OC), fueron separados en geles de agarosa con BrEt. La preparación denominada RepB corresponde a la proteína sin calentar. RepB-45 y RepB-70 representan preparaciones de proteína calentadas a 45 °C o a 70 °C, respectivamente. El

símbolo + indica la preparación de RepB añadida a cada muestra. El símbolo (M) indica que la correspondiente preparación de RepB fue calentada en presencia de una concentración 20 mM de MnCl_2 .

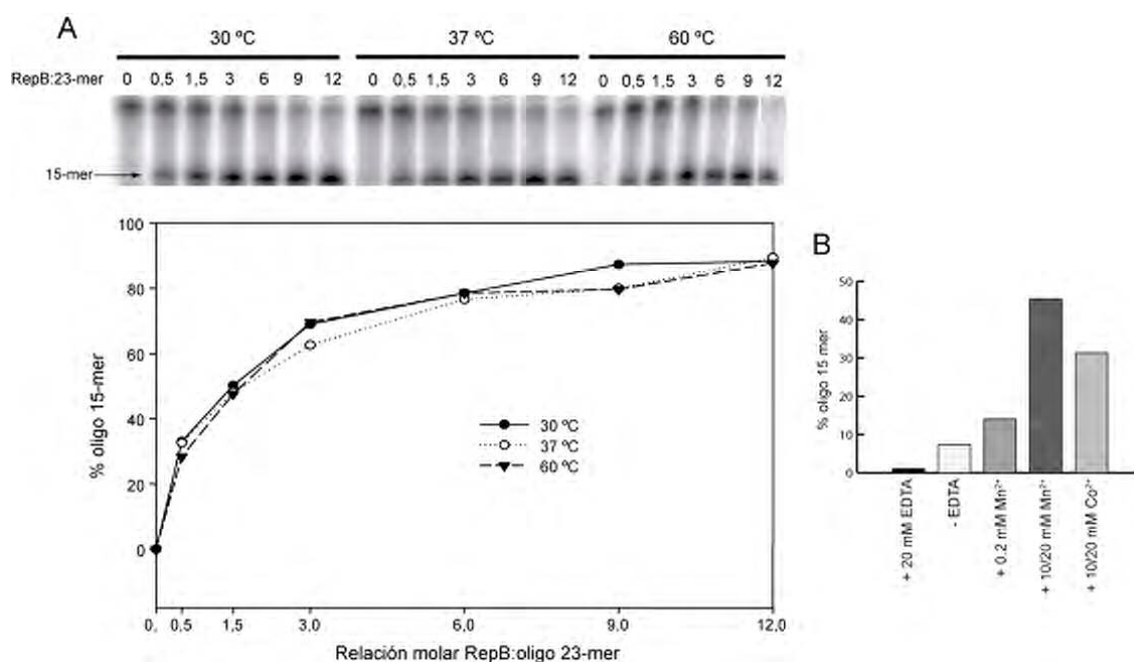


Figura 35. (A) **Actividad de corte de RepB sobre un oligo monocatenario 23-mer.** En estos ensayos se incubó el oligo 23-mer pfx23, marcado radiativamente en su extremo 5', con varias cantidades de RepB (a las relaciones molares indicadas en la figura), en presencia de 20 mM de MnCl_2 y a tres temperaturas diferentes: 30, 37 o 60 °C. En la parte superior se muestran los geles de secuencia donde se analizaron los productos de la reacción de corte. La actividad de corte de RepB se midió por el porcentaje de oligo 15-mer, que constituye el producto de la reacción. (B) Actividad de corte de RepB a 37 °C y una relación molar de proteína:oligo 23-mer de 1,5:1. En estas condiciones, RepB presenta una actividad de corte residual (- EDTA) de un 15 % respecto al porcentaje de corte con 20 mM de Mn^{2+} . Además, la actividad de RepB a concentraciones bajas del ión metálico (+ 0.2 mM Mn^{2+}) es el doble de la actividad residual. La sustitución del ión Mn^{2+} por Co^{2+} (20 mM Co^{2+}) proporcionó niveles de actividad considerables aunque ligeramente inferiores que los obtenidos con la misma concentración de Mn^{2+} (alrededor de un 30 % menos de actividad).

Para definir de un modo más preciso la actividad de corte de RepB y su dependencia de la temperatura, analizamos la digestión de oligos monocatenarios. En concreto, empleamos un oligo 23-mer (pfx23) que contiene la secuencia conservada de corte 5'-TACTACG/AC-3', y que marcamos radiativamente en 5'. Este oligo, que no muestra potencial para formar apareamientos intracatenarios, contiene la secuencia de la región *nic* del plásmido pFX2, (Moscoso *et al.*, 1995b). El sitio de corte (GpA) está situado a 15 nucleótidos de su extremo 5', de manera que el producto de la reacción de corte por RepB será un oligo 15-mer marcado radiativamente. En las reacciones de corte se incubaron 0,9 pmoles de oligo 23-mer con concentraciones crecientes de RepB, a 30, 37 y 60 °C. Los productos de la reacción se separaron mediante electroforesis en geles de secuencia al 20 % de PAA y 8 M de urea. Al representar el porcentaje de oligo 15-mer generado en la reacción de corte respecto a la relación proteína:oligo utilizada en cada ensayo, no se observaron diferencias

significativas en las curvas generadas a las tres temperaturas ensayadas (Figura 35 A). Con independencia de la temperatura utilizada, la saturación se alcanza con una relación 9:1 de proteína:oligo (Figura 35 A). En las reacciones en las que se empleó una relación no saturante proteína-oligo de 1,5:1, se observó que la actividad de corte en presencia de 20 mM de CoCl_2 era un 30 % inferior a la observada con la misma concentración de MnCl_2 (Figura 35 B). A concentraciones del orden de 0,2 mM de MnCl_2 o CoCl_2 , la actividad de corte de RepB es aproximadamente el doble de la que presenta la proteína de forma residual (en ausencia de catión metálico externamente añadido). Esta actividad residual de RepB desaparece al añadir EDTA (Figura 35 B).

En resumen, estos resultados muestran que la dependencia de la temperatura en la actividad de corte y corte/cierre de RepB sobre plásmido SC parece deberse a factores distintos a la actividad endonucleolítica intrínseca de RepB, que afectarían a la exposición del sitio de corte, como el grado de superenrollamiento del DNA plasmídico, o la existencia de otras estructuras secundarias que competirían con la secuencia IR-I por extruirse a 37 °C.

6. Espectro de emisión de fluorescencia de RepB.

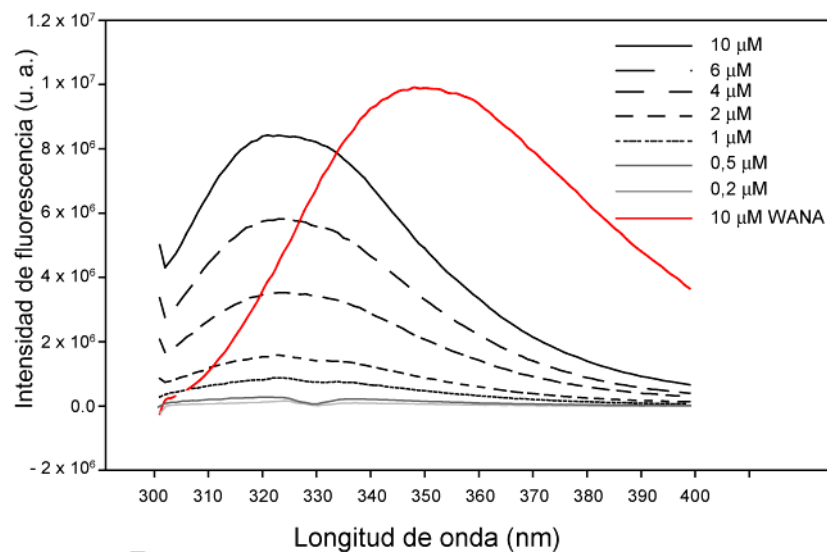
En proteínas que contienen los tres residuos aromáticos, la emisión de fluorescencia está dominada por la contribución de los residuos de triptófano, porque tanto su absorbancia a la longitud de onda de excitación como su rendimiento cuántico de emisión son considerablemente mayores que los respectivos valores para Tyr y Phe. El parámetro “sensibilidad” reúne ambos factores, y su valor es de 1.100 para el Trp y 200 para la Tyr. La fluorescencia de la Phe no se observa en proteínas nativas debido a su baja sensibilidad. Otro factor que influye en la fluorescencia es la transferencia de energía entre residuos. Tanto Tyr como Trp absorben a 280 nm, la longitud de onda donde la Phe emite fluorescencia. La fluorescencia de la Tyr en proteínas que contienen residuos tanto de Trp como de Tyr, es casi indetectable. La emisión del Trp es fuerte, y en proteínas plegadas suele estar desplazada a longitudes de onda más cortas, donde emite la Tyr. Además, en el ambiente compacto de una proteína plegada, el Trp apantalla eficientemente la emisión de fluorescencia de la Tyr.

La emisión de fluorescencia de ambos residuos (Tyr y Trp) se observa cuando se excita a una longitud de onda cercana al máximo de absorbancia, alrededor de 280 nm. Sin embargo, podemos observar selectivamente la fluorescencia del único Trp de RepB (que ocupa la posición 22) con longitudes de onda de excitación mayores o iguales a 295 nm. El espectro de emisión de fluorescencia de RepB tras la excitación a 295 nm se caracteriza por un desplazamiento del máximo de emisión del Trp (348 nm) a longitudes de onda más cortas (320 nm) (Figura 36). Una disminución de la longitud de onda de emisión en unos 20-30 nm es característica de un Trp “enterrado” en el interior de una proteína plegada con un entorno poco polar o hidrofóbico.

Los cambios en la conformación proteica suelen alterar significativamente la emisión de fluorescencia. La intensidad de fluorescencia del único Trp de RepB nos permitió analizar concentraciones de RepB inferiores a 1 μM , a las cuales no se ha podido determinar mediante UA si la proteína continúa siendo un hexámero. La

emisión de fluorescencia de RepB por concentración total de proteína no variaba en el rango entre 0,2 y 10 μM (Figura 36). Este dato indicaría que en este rango de concentración no hay alteraciones estructurales en la proteína que conlleven una variación de la fluorescencia del Trp22. El mismo resultado se obtuvo al considerar la fluorescencia emitida a 282 nm de longitud de onda de excitación (no se muestra). Por tanto, el seguimiento de la emisión de fluorescencia del Trp22 no nos ha permitido detectar cambios en el estado de oligomerización de la proteína que, por otra parte, no podemos descartar que sucedan por debajo de 1 μM de RepB.

A



B

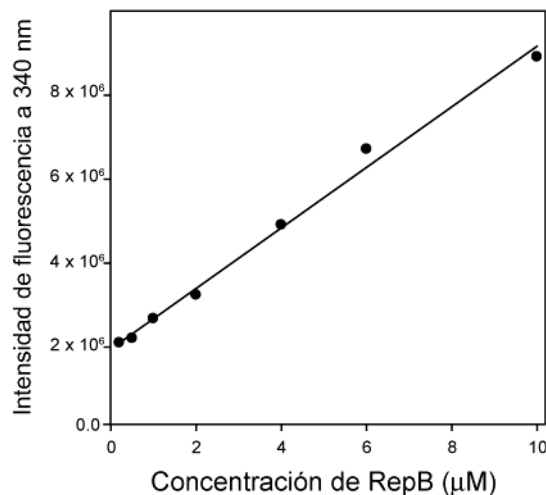


Figura 36. **Emisión de fluorescencia de RepB.** (A) Espectro de emisión de fluorescencia de RepB excitada a 295 nm a las concentraciones de proteína indicadas (0.2 – 10 μM). Por comparación con el espectro de emisión de fluorescencia de una solución 10 μM de triptofanamida (línea roja) se puede observar el desplazamiento del máximo de emisión del Trp22 a menores longitudes de onda. (B) Gráfica que muestra la correspondencia lineal entre la concentración de RepB y la intensidad de fluorescencia del Trp22 a 340 nm. Los valores se ajustaron a una recta mediante regresión lineal.

La emisión de fluorescencia del Trp22 de RepB también se analizó en presencia de los cationes divalentes Mn^{2+} y Co^{2+} , necesarios para la actividad catalítica de la proteína. El espectro de emisión de RepB no cambió significativamente en presencia de concentraciones crecientes (de 0,05 a 2 mM) de $MnCl_2$ o $CoCl_2$ (no se muestra). Por tanto, la emisión del Trp22 no resulta útil para estudiar las características de la unión de los metales, por ejemplo la afinidad de unión por el Mn^{2+} o el Co^{2+} , ya que el catión unido en el centro activo de la proteína no es capaz de alterar su fluorescencia.

7. Experimentos de entrecruzamiento: análisis del estado de asociación de RepB *in vivo*.

Aunque los datos biofísicos indican que RepB es un hexámero estable en un rango de concentración bastante amplio, la situación en el interior de la célula puede ser diferente. El uso de agentes de entrecruzamiento, junto con la disponibilidad de anticuerpos frente a RepB, nos ha permitido determinar el estado de oligomerización de la proteína en *S. pneumoniae*, bacteria huésped de pMV158. En principio decidimos probar con los agentes homobifuncionales BS³ y DSP, que contienen un éster de N-hidroxisuccinimida (o éster-NHS) en cada extremo de un brazo espaciador formado por 8 carbonos. Los ésteres-NHS reaccionan con las aminas primarias a pH fisiológicos y forman enlaces amida estables liberando un grupo N-hidroxisuccinimida. Los grupos accesibles α -amino presentes en el extremo amino de las proteínas y las ϵ -aminas de los residuos Lys son capaces de reaccionar con los ésteres-NHS para formar enlaces amida. El compuesto DSP es permeable a las membranas, y presenta un enlace disulfuro en el brazo espaciador (12 Å) que permite su rotura en presencia de un agente reductor. Por el contrario, el compuesto BS³ es soluble en agua y su brazo espaciador (11,4 Å) no se puede cortar.

Antes de realizar el experimento *in vivo*, probamos la capacidad de estos agentes para estabilizar el hexámero de RepB en la proteína purificada. Al analizar las muestras de proteína incubadas con BS³ por electroforesis en geles de PAA/SDS, observamos una única banda con una migración electroforética que, por comparación con el marcador de peso molecular, correspondía a una proteína de unos 140.000 Da, equivalente al hexámero de RepB (Figura 37 A). El tratamiento con DSP no dio lugar a la aparición de ninguna banda discreta de proteína, lo que sugiere la formación de agregados que no atraviesan la trama del gel.

En los experimentos de entrecruzamiento *in vivo*, los cultivos de la estirpe T4 de *S. pneumoniae* con el plásmido pMV158 fueron tratados con distintas concentraciones de BS³ (desde 0,5 hasta 10 mM). Aunque el BS³ es insoluble en agua, su utilidad como agente de entrecruzamiento *in vivo* en bacterias Gram-positivas ya había sido descrita (Serrano-Heras *et al.*, 2003). Como experimento control, tratamos con BS³ un cultivo de la estirpe T4 libre de plásmido. Tras el tratamiento con el agente de entrecruzamiento y la lisis celular, que se realizaron tal y como se describe en el apartado 2.9.2 de Métodos, los extractos proteicos resultantes se

sometieron a electroforesis en geles de PAA/SDS, y se analizaron mediante “Western-blot” con un suero policlonal anti-RepB de conejo.

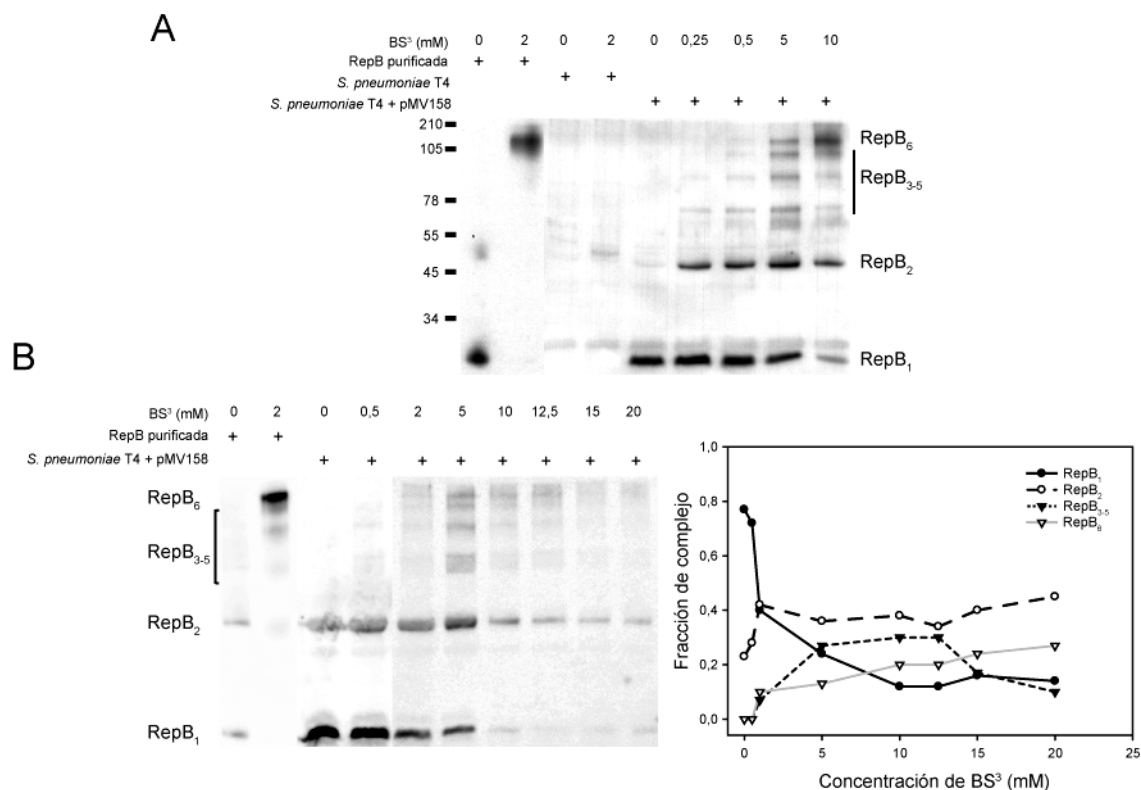


Figura 37. Experimentos de entrecruzamiento de RepB *in vivo*. (A) Los cultivos de la estirpe T4 de *S. pneumoniae* con pMV158 se crecieron hasta una OD₆₅₀ de 0,3 y se incubaron con diferentes cantidades de BS³. Los extractos de proteína totales se resolvieron en geles de PAA/SDS y se analizaron mediante “Western-blot” con un suero policlonal anti-RepB. Para facilitar la identificación de los complejos de RepB se empleó proteína RepB purificada y dos concentraciones de BS³ (0 y 2 mM). Como control del experimento, se analizaron los extractos proteicos procedentes de cultivos de *S. pneumoniae* sin pMV158 tratados con 0 y 2 mM de BS³, lo que nos permitió determinar el origen específico de las bandas que atribuimos a RepB. Al analizar los extractos proteicos procedentes de cultivos con pMV158 pudimos detectar una serie de bandas específicas, cuya proporción variaba con la concentración de BS³, que corresponderían a las posibles formas oligoméricas de RepB, desde el monómero hasta el hexámero. El peso molecular de los marcadores de proteínas preteñidos se indica en la parte izquierda en kDa. En la parte derecha se indica la posición de los diferentes complejos de RepB detectados. (B) Para evitar los efectos que la limitación intracelular de agente de entrecruzamiento pudiera tener en la interpretación de los resultados, decidimos aumentar la cantidad de BS³ hasta alcanzar concentraciones saturantes de 20 mM. Los experimentos se realizaron como se describe anteriormente y la señal de quimioluminiscencia se detectó mediante un sensor acoplado a una cámara CCD en el equipo LAS-3000 (Fuji). Las imágenes digitales se cuantificaron con el programa Quantity One (Bio-Rad) y la fracción de cada uno de los complejos específicos de RepB se representó frente a la concentración de BS³. En la gráfica resultante se puede observar la evolución del material entrecruzado y no entrecruzado específico de RepB, que, en condiciones de saturación de BS³, está representado mayoritariamente por dímeros y hexámeros. Cabe destacar que con concentraciones superiores a 5 mM de BS³ se observó resistencia a la lisis celular. En la parte izquierda de la imagen del “Western-blot” se indica la posición de los diferentes complejos de RepB detectados.

Los resultados de los experimentos *in vivo* se muestran en la Figura 37. Al hibridar con el antisuero de RepB las muestras procedentes del experimento control, se observaron algunas bandas tenues que se deberían a la reacción cruzada con proteínas del hospedador. El resto de bandas que aparecen en las muestras procedentes de los cultivos con plásmido, serían específicas de RepB. En las muestras procedentes de cultivos de *S. pneumoniae* con pMV158 se detectaron bandas que, por sus migraciones electroforéticas, corresponderían a diferentes estados de asociación de RepB, incluido el hexámero [(RepB)₆]. La identificación de (RepB)₆ en las células de *S. pneumoniae* donde pMV158 replica activamente, sugiere su importancia funcional en el mecanismo de replicación del plásmido. La visualización de los distintos oligómeros de proteína está relacionada con la concentración de BS³ utilizada. Con concentraciones bajas de BS³ (0,25 – 0,5 mM) se observó un claro incremento, con respecto a la muestra sin tratar, del producto específico de unos 48 kDa correspondiente al dímero de RepB (Figura 37 A). A una concentración de 5 mM de BS³ se observó material entrecruzado específico migrando entre 55 y 210 kDa, que correspondería a diferentes homo-complejos de RepB, desde el trímero hasta el complejo de mayor peso molecular (RepB)₆ (Figura 37 A). Para obtener una información lo más ajustada posible a la realidad del interior celular, evitando los artefactos derivados de la limitación de agente de entrecruzamiento, decidimos analizar la distribución de complejos de RepB a concentraciones saturantes de BS³ (hasta 20 mM). En la gráfica de la Figura 37 B se muestra la variación de la fracción de complejos específicos de RepB en función de la concentración de BS³. La disminución de las formas monoméricas de RepB está relacionada con el aumento de otras formas oligoméricas de la proteína. La fracción de dímero de RepB presenta un aumento inicial que coincide con la disminución de monómero y, tras llegar a representar algo más de un 40 % de las formas específicas de la proteína, se mantiene invariable frente al aumento de agente de entrecruzamiento. La fracción del material comprendido entre (RepB)₃ y (RepB)₅ también aumenta inicialmente, aunque a mayores concentraciones de BS³ sigue una clara tendencia decreciente. Esta evolución refleja la progresiva formación de complejos covalentes correspondientes a los distintos oligómeros de RepB hasta llegar al hexámero. A concentraciones saturantes de BS³, el material correspondiente a RepB se encuentra mayoritariamente en forma (RepB)₂ y (RepB)₆. Así, estos resultados demuestran que (RepB)₆ está presente *in vivo* y que parece coexistir con la forma dimérica de la proteína, aunque no podemos descartar que exista también una pequeña fracción de monómero.

8. Determinación de la estructura tridimensional del hexámero de RepB.

La resolución de la estructura tridimensional de (RepB)₆ libre y unida al DNA del origen de replicación es un proyecto que se está desarrollando gracias a la colaboración con tres grupos: el grupo de Biología Estructural de Proteínas, Ácidos Nucleicos y sus Complejos, dirigido por el Prof. Miquel Coll en el IBMB de Barcelona, el grupo de Microscopía Electrónica y Reconstrucción Tridimensional de Macromoléculas, dirigido por el Dr. Oscar Llorca en el CIB de Madrid, y el grupo de

Bioinformática Estructural, dirigido por el Dr. Pablo Chacón, también en el CIB de Madrid. Gracias a esta colaboración tenemos datos sobre la estructura de RepB a un nivel de resolución atómica procedentes de la difracción por rayos X de dos cristales diferentes de proteína, así como información de baja resolución de la estructura de la proteína libre y unida al DNA del locus *bind*.

8.1. Estructura global del hexámero de RepB por cristalografía de rayos X.

La información sobre la estructura tridimensional del hexámero de RepB procede de los cristales de proteína que se obtuvieron con dos formas cristalinas diferentes: tetragonal y trigonal. En la estructura del protómero de RepB se pueden distinguir dos dominios principales (Figura 38 A), el dominio endonucleasa en la región N-terminal y el dominio C-terminal de hexamerización, unidos por una región flexible que actuaría a modo de bisagra. En el dominio endonucleasa se observa una alternancia de hélices α y cadenas β , que contrasta con el dominio C-terminal compuesto únicamente por hélices α .

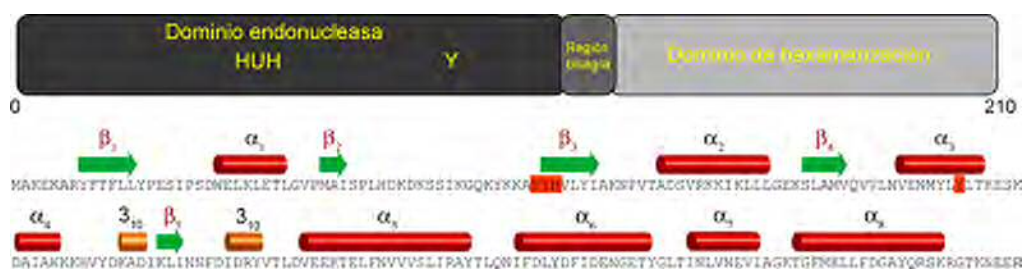
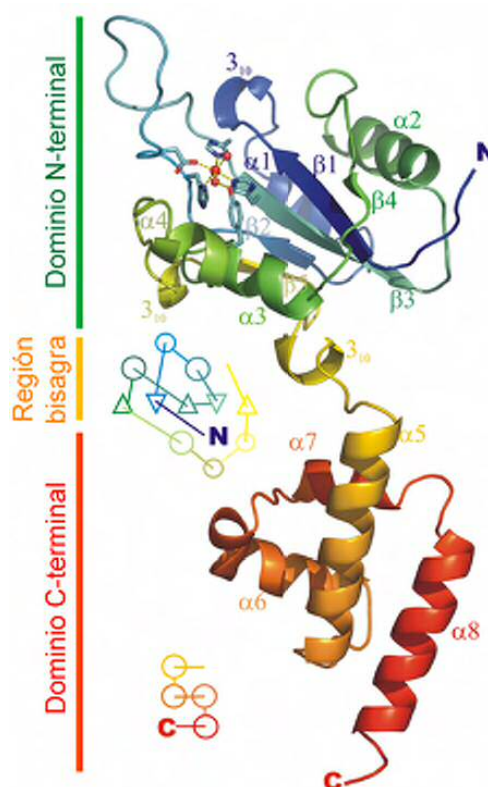
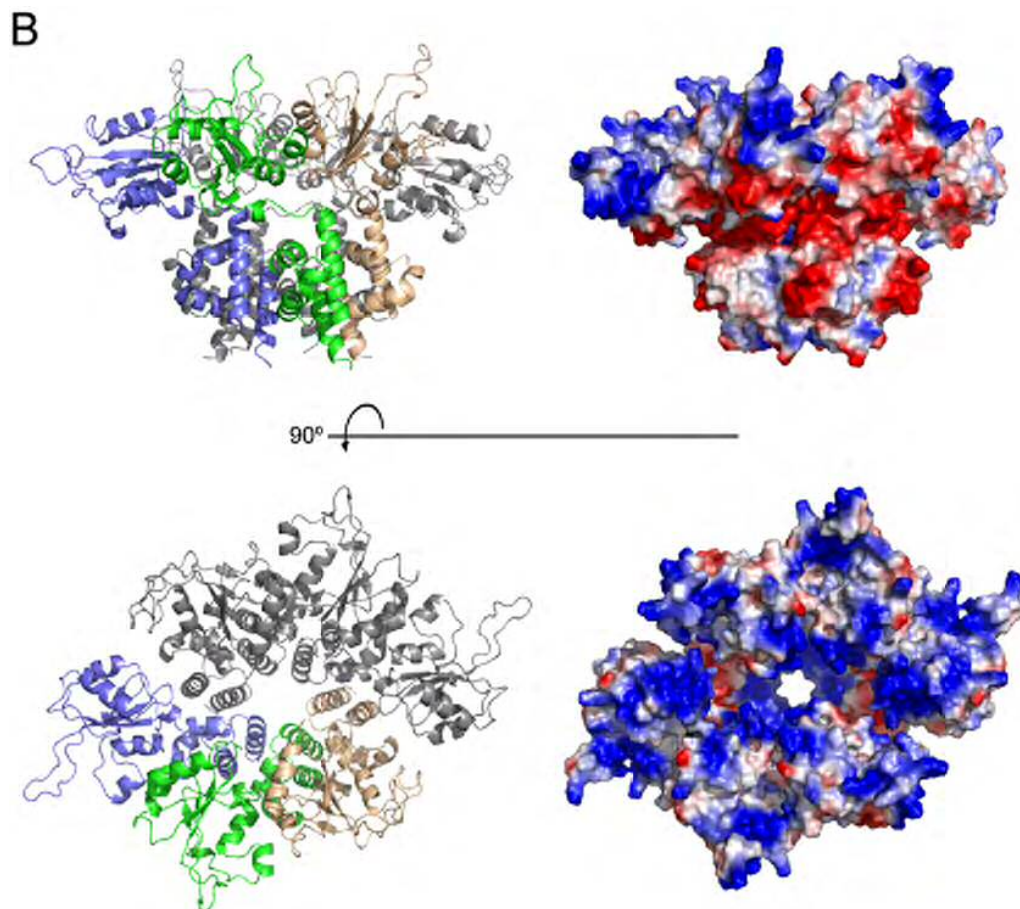


Figura 38. **Estructura tridimensional de RepB por cristalografía de rayos X.** (A) La estructura del protómero de RepB está organizada en dos dominios, el N-terminal o dominio endonucleasa, y el dominio C-terminal o dominio de hexamerización, conectados entre sí por una región bisagra. En la parte superior de la figura se muestra un esquema donde se indican los elementos de estructura secundaria sobre la secuencia de aminoácidos. Los residuos HYH del motivo 2 o HUH, y el residuo Y catalítico aparecen coloreados en rojo. En la parte inferior se muestra una representación de la estructura tridimensional de un protómero de RepB, donde se indican los diferentes elementos de estructura secundaria, así como los límites de cada dominio.



Aunque la estructura global del hexámero de RepB es parecida en ambas formas cristalinas, existen diferencias significativas que afectan a la disposición del dominio N-terminal de los diferentes protómeros. La región C-terminal es la responsable de la formación del hexámero de proteína, y está constituida por 4 hélices α (α_5 - α_8) que se disponen para formar un anillo hexamérico, con un eje de simetría rotacional senario, de unos 38 Å de alto por unos 65 Å de diámetro externo, que deja en su interior un canal de unos 15 Å de diámetro en la parte más estrecha (Figura 38 B). La región bisagra, que une la cadena β_5 con la hélice α_5 , está formada por una porción de cadena polipeptídica extendida en la que se intercala una hélice tipo 3_{10} . La flexibilidad de esta región explicaría la variación en la disposición de los dominios N-terminales en la otra región del hexámero. En la estructura de la proteína que forma cristales trigonales, la región N-terminal del hexámero de RepB presenta un eje de simetría rotacional binario, de manera que tres dominios N-terminales están separados de los otros tres por un surco de unos 80 Å de longitud (Figura 38 B). Al superponer la estructura de los dominios C-terminales que forman un trímero se observa que los dominios N-terminales presentan un cierto ángulo de giro, que efectúan sobre la porción bisagra, para formar una especie de semicírculo (Figura 38 B). La disposición de los dominios N-terminales en el cristal tetragonal es diferente, y se observa que uno de los monómeros ocluye uno de los extremos del surco, rompiendo el eje de simetría binaria que aparecía en el cristal tetragonal (no se muestra).



(B) Estructura global del hexámero en el cristal trigonal y potencial electrostático en superficie. Se muestran dos vistas diferentes de la estructura del hexámero de RepB, con los protómeros de un mismo trímero coloreados de azul, verde y marrón (parte izquierda), y de su potencial electrostático en superficie (parte derecha). Se puede apreciar que la región interior de la porción amino es altamente electro-positiva.

Por otro lado, considerando el potencial electrostático de la superficie del hexámero de RepB podemos distinguir dos regiones: una electronegativa, que comprende la cara externa del anillo hexamérico de la parte C-terminal y una porción de la cara externa del dominio N-terminal, y otra electropositiva, que comprende la mayor parte de la región N-terminal y toda la superficie de la cara interna del hexámero, incluido el canal interno situado en la parte C-terminal. Esta distribución de la carga en la superficie de RepB tiene implicaciones, como veremos más adelante, en la interacción específica con el DNA de origen.

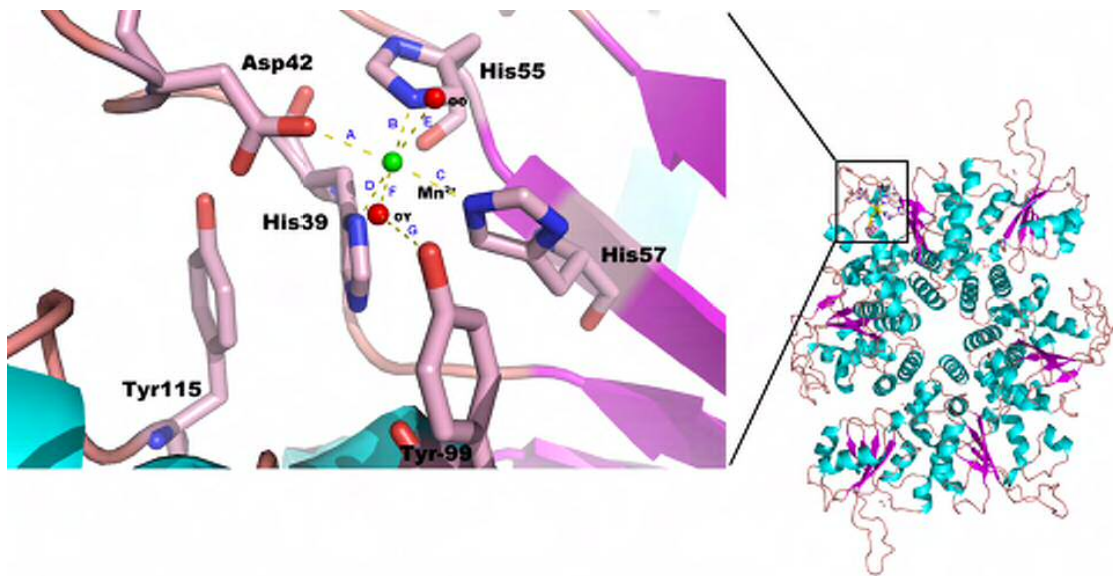
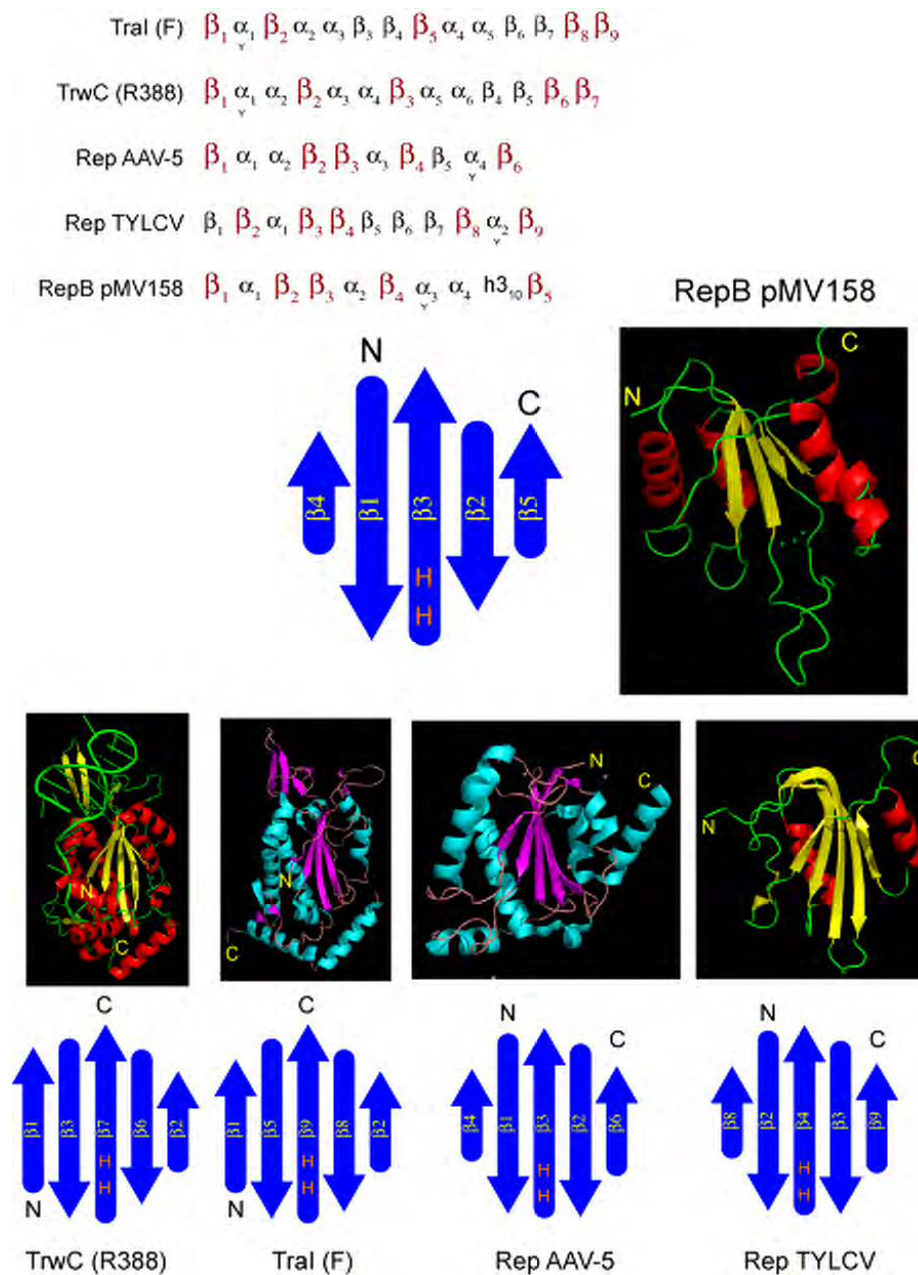


Figura 39. (A) **Estructura del centro activo de RepB.** El Mn^{2+} unido está coordinado por las cadenas laterales de los residuos His55, His57, His39, Asp42 y dos moléculas de agua, con una geometría octaédrica. Una de las moléculas de agua está formando un puente de hidrógeno con la Tyr99 catalítica. Las distancias entre los átomos son: A, 2,25 Å (Asp 42 O - Mn^{2+}), B, 2,24 Å (His55 Nε2 - Mn^{2+}), C, 2,27 Å (His57 Nε2 - Mn^{2+}), D, 2,24 Å (His39 Nδ1 - Mn^{2+}), E, 2,25 Å (agua - Mn^{2+}), F, 2,25 Å (agua - Mn^{2+}), G, 2,94 Å (Tyr99 OH - agua).

La estructura del dominio endonucleasa consiste en una lámina β central formada por cinco cadenas antiparalelas flanqueadas por dos hélices α a un lado (α_1 y α_2) y otras dos hélices α (α_3 y α_4) y una hélice 3_{10} por el otro, formando un dominio con unas dimensiones aproximadas de 45 Å x 37 Å x 27 Å. En uno de los lados de la lámina β se localiza una cavidad formada por cuatro de las cadenas β (β_1 , β_3 , β_2 , y β_5), la hélice α_3 y el lazo entre las cadenas β_2 y β_3 (Figura 38 A). El residuo catalítico Tyr99 está situado en la hélice α_3 (Figura 39), con los residuos His55 e His57, que constituyen el motivo HUH, muy próximos. Los residuos His55 y His57 están situados en la cadena central β_3 , y junto con la His39 constituyen las tres histidinas que participan en la coordinación (con geometría octaédrica) de un ión de Mn^{2+} que se

encuentra a 4,96 Å del grupo hidroxilo de la Tyr99. Los tres ligandos proporcionados por la tríada de histidinas corresponden al nitrógeno Nε2 de los residuos His55 y 57, y al Nδ1 de la His39 (Figura 39). Este patrón de coordinación requiere que dos de las tres histidinas se encuentren en la forma tautomérica NδH. En la unión del ión manganesoso también interviene el oxígeno del grupo carboxilato de la cadena lateral del Asp42 y los oxígenos de dos moléculas de agua (Figura 39). Curiosamente, los residuos His39 y Asp42 forman parte del motivo de secuencia conservada R-II identificado en las proteínas Rep de los plásmidos de la familia de pMV158 [(del Solar *et al.*, 1993a); véase Figura 6]. Otra característica de la arquitectura del centro activo es el lazo de 19 residuos que conecta las cadenas β₂ y β₃, ya que forma una proyección básica que podría regular el acceso a la cavidad que contiene el centro activo.



(B) Comparación del plegamiento del dominio endonucleasa de RepB con las proteínas de las clases Rep y Mob. En la parte superior se muestra la secuencia de elementos de estructura secundaria del dominio endonucleasa de cada una de las proteínas indicadas. Se indican en rojo las cinco cadenas β que constituyen la lámina central, y con una Y la hélice α que contiene el residuo Y catalítico del centro activo. En la parte inferior se muestran de izquierda a derecha las estructuras de: TrwC de R388 en complejo con un ssDNA 24-mer (Guasch *et al.*, 2003) (código PDB 1qx0), Tral36 de F (Datta *et al.*, 2003) (código PDB 1p4d), Rep de AAV-5 (Hickman *et al.*, 2002) (código PDB 1m55), y Rep de TYLCV (Campos-Olivas *et al.*, 2002) (código PDB 1l2m). Debajo de cada estructura se muestra la topología de la lámina β central (formada por cinco cadenas antiparalelas), incluida la orientación relativa de sus extremos amino y carboxilo (N y C). Se puede apreciar que tanto Tral como TrwC está permutadas circularmente respecto a las (3) proteínas Rep.

La estructura del dominio N-terminal endonucleasa de RepB presenta el plegamiento característico de las proteínas de la de las clases *Rep* y *Mob*, con la lámina β central, formada por cinco cadenas antiparalelas, y las hélices α a ambos lados de la lámina β . En comparación con el resto de estructuras conocidas, la estructura del dominio endonucleasa de RepB es más parecida a las de las proteínas Rep de los virus AAV-5 y TYLCV (Figura 39 B). Este parecido no sólo se refiere a la topología de las cadenas que forman la lámina β central, diferente de la que se observa en las proteínas de la clase Mob debido a la posición de la Tyr catalítica relativa al motivo HUH, sino por la cantidad de elementos de estructura secundaria que acompañan al núcleo central (Figura 39 B).

8.2. Reconstrucción tridimensional por microscopía electrónica de RepB y de RepB unida al DNA del locus bind.

8.2.1. Introducción a la técnica.

La información que proporcionan las imágenes de microscopía electrónica (ME en adelante) posee una utilidad que procede no sólo de su análisis cualitativo sino también de su análisis cuantitativo. A partir de estas imágenes podemos conocer tanto la forma como la densidad de los objetos y su variación en el interior de los mismos. Por tanto, un análisis cuantitativo de esta información puede conducir a la determinación de la estructura del objeto de estudio, incluso a un nivel de resolución atómica. En este tipo de ME, que podríamos llamar cuantitativa, desempeña un papel importante el registro y procesamiento de la información generada por el microscopio, que se realiza por métodos computacionales.

Uno de los problemas en la determinación estructural por ME reside en el bajo contraste de las imágenes. Para solventarlo se utilizan una serie de técnicas que persiguen aumentar la relación señal/ruido básicamente mediante un promediado de las imágenes. Estas técnicas de procesamiento se basan en un tratamiento digital de las imágenes, por lo que es necesario convertir la información analógica contenida en las placas fotográficas a formato digital para su procesamiento computacional. El uso de especímenes ordenados facilita el promediado de las imágenes. Las estructuras ordenadas pueden aparecer en la naturaleza o se pueden obtener *in vitro*. Las más adecuadas para su estudio por ME de transmisión son los cristales bidimensionales,

las estructuras helicoidales y los virus icosaédricos. Sin embargo, en la práctica no es siempre posible la obtención de una estructura ordenada y los esfuerzos se han encaminado al desarrollo de métodos para el promediado y la reconstrucción de partículas individuales no ordenadas. El procesamiento bidimensional de partículas individuales comienza con la selección de las partículas de la placa de micrografía. El número de partículas que se seleccionan suele ser del orden de 1.000 a 10.000. Posteriormente se someten a un alineamiento traslacional y rotacional para que estén bien centradas. Ya que la población de partículas no es homogénea, ya sea por su diferente orientación, por ser confórmers distintos o, simplemente, por ser distintas, es necesario un proceso de clasificación de las diferentes poblaciones existentes. Finalmente, cada una de las poblaciones se somete de manera independiente a un proceso de promediado para obtener una imagen media con una mayor relación señal/ruido.

Aunque existen varios métodos para realizar la reconstrucción tridimensional de partículas individuales, el más usado es el refinamiento angular, el cual requiere un modelo inicial y la proyección de las partículas en el mayor número posible de direcciones en el espacio. Si las partículas se depositan en la rejilla con una orientación preferencial, el modelo inicial se puede generar con el método de inclinación cónica al azar o RCT (*r*andom *c*onical *t*ilt). Este método se basa en la utilización de partículas inclinadas para poder reconstruir el volumen de la molécula a la que representan. Una vez obtenido el volumen inicial de la molécula en estudio se procede con el método de refinamiento angular, que consiste en un proceso iterativo en el que las proyecciones teóricas del volumen inicial en todo el espacio se comparan con las imágenes experimentales. La obtención de los ángulos correctos de cada proyección es crucial para una buena reconstrucción tridimensional. Como estos ángulos se desconocen es necesario estimarlos. Esta estimación se realiza normalmente comparando las proyecciones de un volumen similar al volumen que se quiere reconstruir con las imágenes obtenidas del microscopio. Una vez que se han asignado los ángulos a las imágenes experimentales, se realiza una primera reconstrucción que genera un nuevo volumen con más resolución que el anterior. Este nuevo volumen se utiliza como el anterior y el proceso iterativo se repite hasta que la resolución de los volúmenes obtenidos no mejora.

Gracias al desarrollo de herramientas informáticas como las que se recogen en los programas EMAN (Ludtke *et al.*, 1999) o XMIPP (Sorzano *et al.*, 2004), es posible realizar el proceso completo de reconstrucción tridimensional de partículas individuales a partir de las imágenes adquiridas por ME.

8.2.2. Reconstrucción tridimensional de RepB.

Aunque el nivel de resolución teórico de la ME es atómico, en la práctica nos encontramos con un nivel de resolución que oscila entre 25 y 10 Å. En la actualidad se han desarrollado algunas técnicas, como la crio-microscopía, que han permitido bajar esta resolución, en algunos casos hasta los 6 Å, aunque con partículas mayores de 250 kDa. En el caso de RepB, donde el tamaño de las partículas del hexámero (144

kDa) está en el límite inferior para su análisis por ME, se utilizó el método de tinción negativa con acetato de uranilo para la visualización de las partículas de proteína. Con esta técnica, y debido al tamaño del grano del agente de tinción, la resolución está limitada a unos 15-20 Å. Un análisis preliminar de las imágenes de RepB mostró que la proteína se estaba depositando sobre la superficie de la rejilla con un número limitado de orientaciones, lo que impediría una correcta reconstrucción tridimensional de las partículas de proteína. Por esta razón, y para obtener un volumen inicial sin ningún sesgo, de forma que pudiera ser utilizado en las siguientes etapas de refinamiento angular, se decidió aplicar el método RCT. Con este fin, se adquirieron imágenes de las partículas de RepB inclinando la muestra 20 y 40 grados.

Durante el procesamiento de las imágenes se analizó la simetría rotacional de las partículas de RepB, ya que podía constituir un determinante en el proceso de reconstrucción tridimensional de la proteína. Este análisis mostró la presencia de componentes con simetría 2, 3 y 6, tanto en partículas de RepB libres como en las unidas a DNA. Para determinar la simetría correcta de la muestra se realizaron una serie de análisis que indicaron que, al menos en las condiciones experimentales empleadas, las moléculas de RepB se caracterizaban por una simetría rotacional binaria. Además, al someter los datos experimentales a un análisis de “multirefinamiento”, implementado en el programa EMAN, forzando la reconstrucción simultánea con una simetría de 2,3 o 6, se observó en todos los casos una mejor correlación de las partículas de RepB con una reconstrucción con simetría binaria, lo que refuerza esta selección.

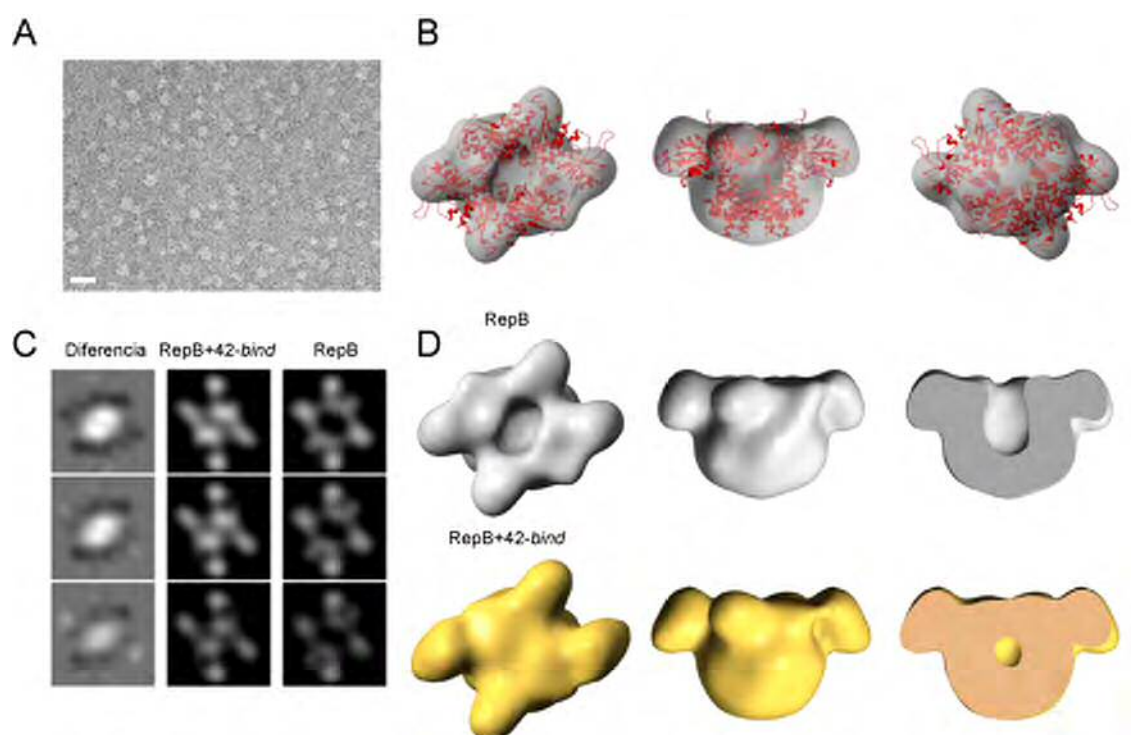


Figura 40. **Reconstrucción tridimensional por ME de RepB y de RepB unida a DNA.** (A) La imagen muestra un campo representativo de una micrografía electrónica obtenida de una preparación de RepB. La barra de escala es de 200 Å. (B) Se muestran varias vistas de la reconstrucción tridimensional de RepB (superficie gris) con la estructura atómica de RepB

superpuesta (cintas rojas). (C) En la imagen se muestran las vistas de tres secciones de la reconstrucción de RepB y de RepB unida al DNA 42-*bind* en la región del surco. En el panel de la izquierda se muestran las secciones equivalentes del mapa de diferencias entre ambas estructuras. (D) Comparación entre dos vistas (izquierda y centro) de la estructura de RepB (superficie gris) y de RepB unida a DNA (superficie amarilla). En la parte derecha de este panel se muestra la vista de un corte de la estructura de RepB libre y unida a DNA.

Finalmente, la reconstrucción tridimensional de RepB con una simetría binaria, a una resolución de 22 Å, y obtenida por refinamiento iterativo de un modelo inicial por RCT, mostró una estructura en la que se pueden distinguir dos dominios que se disponen como si de un “cuerpo” salieran unas “extremidades”, con una cavidad interior (Figuras 40 A y B). La región “cuerpo” es más compacta y presenta una marcada simetría senaria, mientras que la otra región muestra seis protuberancias, que parecen disponerse alrededor de la cavidad central, con una simetría binaria. Todas estas características estructurales también se pueden apreciar en la estructura global del hexámero de RepB obtenida por rayos X a partir de los cristales trigonales. Estas semejanzas estructurales fueron confirmadas mediante métodos computacionales que demostraron la estrecha relación entre la estructura cristalina de RepB y el mapa de ME (Figura 40 B). Por ejemplo, el canal que atraviesa el hexámero de RepB se corresponde con la cavidad que se observa en el mapa de ME. El dominio de hexamerización C-terminal, que posee un eje de simetría rotacional senario, se corresponde con la región “cuerpo” del mapa de ME, también con simetría 6. Por último, los datos de ME en la región con protuberancias son consistentes con la simetría rotacional binaria del dominio N-terminal, aunque se observan algunos desajustes entre el mapa de ME y la estructura cristalina de esta región, que pueden ser debidos a la flexibilidad intrínseca de esta región y a la baja resolución del mapa de ME.

La reconstrucción tridimensional de RepB unida al DNA se realizó mediante la visualización en el microscopio de los complejos formados por RepB y el fragmento de DNA 42-*bind*, que contiene las tres repeticiones directas de 11 pb que constituyen el locus *bind* (apartado 3.1 de Materiales). Con planteamientos y estrategias similares a las utilizadas en la reconstrucción de RepB, se consiguió una estructura del complejo RepB-DNA, con una resolución de 24 Å, muy parecida a la de RepB sin DNA (Figuras 40 C y D). Este parecido fue confirmado mediante el ajuste por métodos computacionales tanto con la estructura cristalina como con la reconstrucción por ME de la proteína sin DNA. Sin embargo, aunque la unión al dsDNA específico no altera la arquitectura global de la proteína, sí se pueden apreciar diferencias importantes entre ambas estructuras en la región del canal debido a la aparición de una densidad extra que ocluye el acceso a esta cavidad (Figuras 40 C y D). Puesto que no existen otras diferencias importantes entre la estructura de RepB libre y unida al DNA, lo más probable es que el DNA se asiente sobre la región N-terminal ocluyendo la entrada del agente de tinción al interior de la cavidad.

8.3. Análisis de la estequiometría de la unión entre RepB y el DNA del locus *bind*.

Los resultados del análisis de alta resolución de los contactos de RepB con el locus *bind* (Capítulo 1 de Resultados) sugieren que en la proteína hexamérica existirían tres motivos idénticos de unión a DNA que se unirían a las tres repeticiones directas del locus *bind* del origen de replicación. En principio, cada uno de estos motivos podría ser aportado por uno solo o por dos de los protómeros que constituyen el hexámero de RepB. En el primero de estos supuestos, un hexámero de proteína podría unir simultáneamente dos moléculas de DNA que tuvieran el locus *bind*, en tanto que en el segundo caso sólo una de estas moléculas podría ser albergada. Para la correcta interpretación de los resultados de la reconstrucción tridimensional de la proteína era importante discernir entre ambas alternativas. Para ello, realizamos unos sencillos ensayos de retardo en gel en los que se analizaron los complejos formados tras la incubación de RepB con una mezcla de los fragmentos 42-*bind* (42 pb) y 123-*bind* (123 pb), ambos portadores de la secuencia del locus *bind*. Por los ensayos de UA (apartado 2 de este Capítulo) sabíamos que la proteína sigue siendo un hexámero a la concentración más baja utilizada en estos ensayos ($0,17 \mu\text{M}$ de $(\text{RepB})_6$, que equivale aproximadamente a $1 \mu\text{M}$ de protómero de proteína). Si RepB era capaz de interaccionar con dos locus *bind*, podría unirse simultáneamente a ambos fragmentos generando un nuevo complejo ternario proteína/42-*bind*/123-*bind* con una movilidad electroforética relativa intermedia entre la movilidad de los complejos formados por RepB con cada uno de los DNAs por separado. Sin embargo, los resultados de este ensayo (Figura 41 A) mostraron sólo la formación de los dos complejos debidos a la unión de RepB a uno u otro fragmento por separado, pero en ningún caso se observó la formación de un complejo de movilidad intermedia, lo que parece descartar la unión simultánea de un hexámero de RepB a dos moléculas de DNA.

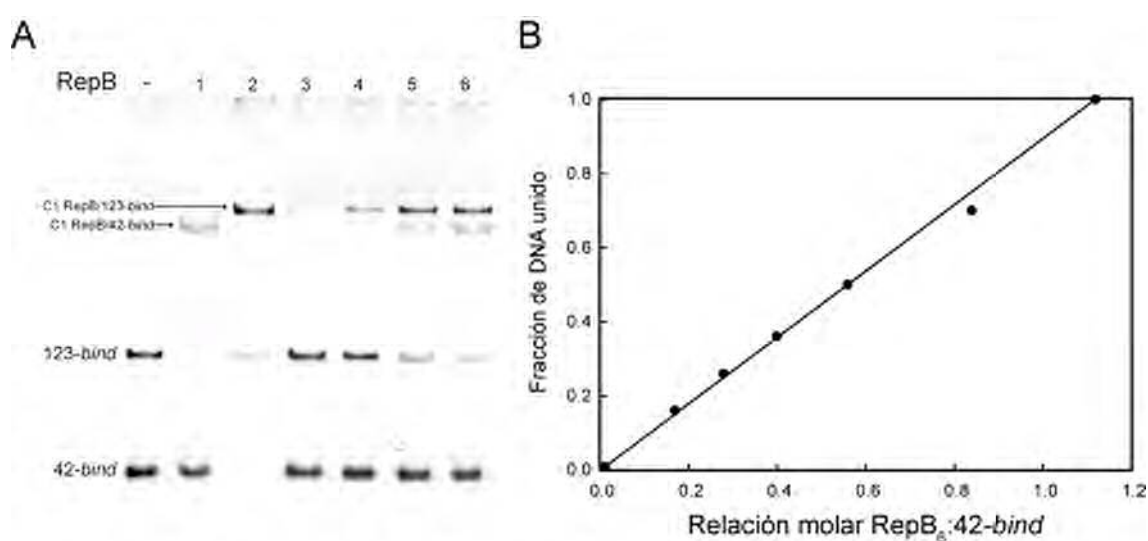


Figura 41. **Análisis de la estequiometría de la unión de RepB al locus *bind*.** (A) Ensayo de detección de posibles complejos ternarios en la unión de RepB al locus *bind*. Se utilizó un oligo bicatenario de 42 pb con las tres repeticiones directas de 11 pb que constituyen el locus *bind*

(42-*bind*) y un fragmento de DNA de 123 pb que también incluye el locus *bind* (123-*bind*). Ambos fragmentos de DNA se incubaron simultáneamente con cantidades crecientes de RepB. En la figura se indica la posición de los dos DNAs y de los diferentes complejos RepB-DNA. En las calles 1 y 2 se muestran los complejos generados por la unión de RepB a los DNAs 42-*bind* y 123-*bind* por separado. Cuando ambos DNAs estaban presentes en la mezcla de reacción no se observó un complejo ternario correspondiente a la unión simultánea de RepB a 42-*bind* y 123-*bind*. La concentración de RepB activa fue: 0 (-), 0,2 μ M (calles 1 y 2), 0,1, 0,14, 0,2 y 0,25 μ M (calles 3-6, respectivamente). (B) Análisis de la estequiometría de unión entre RepB y el DNA 42-*bind*. La gráfica muestra el resultado del ensayo de retardo en gel donde, con una concentración fija de DNA (0,5 μ M), fuimos aumentando la concentración de proteína hasta alcanzar una relación 1,12:1 de (RepB)₆ frente a 42-*bind*. Los puntos de la gráfica se ajustaron a una recta mediante regresión lineal. La pendiente de esta recta es la constante de proporcionalidad que relaciona la fracción de DNA unido con la concentración de proteína activa, y nos indica que cada hexámero de RepB une aproximadamente 0,89 (\pm 0,08) moléculas de DNA 42-*bind*.

Para completar el análisis de la unión de RepB al DNA del locus *bind*, realizamos ensayos de retardo en gel con el fin de analizar la estequiometría de unión entre RepB y el fragmento 42-*bind*. En estos experimentos, realizados en condiciones de unión estequiométrica, se incubó una concentración fija de DNA (0,5 μ M) con cantidades crecientes de la proteína. Como en el experimento anterior, RepB presenta una configuración hexamérica a las concentraciones de proteína utilizadas. El incremento de la concentración de RepB produjo un aumento lineal de la fracción de DNA unido a la proteína en forma de complejo C1 hasta que comenzó a aparecer el complejo C2, una vez que casi había desaparecido el DNA libre (Figura 41 B). Al representar la fracción de DNA unido frente a la relación molar (RepB)₆:42-*bind* obtuvimos una recta cuya pendiente representa el número de moléculas de DNA unidas por cada hexámero de la proteína. De esta manera pudimos estimar que aproximadamente una molécula (0,89 \pm 0,08) de DNA del locus *bind* se unía a cada hexámero de RepB, lo que confirma las conclusiones obtenidas en el experimento de incubación simultánea de la proteína con dos fragmentos *bind* distintos (Figura 41 A).

CAPÍTULO 3:

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y BIOQUÍMICA DE LA HELICASA PcrA DE
Streptococcus pneumoniae Y SU FUNCIÓN EN LA REPLICACIÓN DE
PLÁSMIDOS RC

En este Capítulo del trabajo de tesis doctoral se ha realizado una primera caracterización genética y bioquímica de la helicasa PcrA de *S. pneumoniae* (PcrASpn). Una característica bien conocida de muchos plásmidos RC es su capacidad para establecerse y replicar en diferentes bacterias. A pesar de que otros factores, como el reconocimiento específico de diferentes tipos de orígenes de cadena retrasada (ssos) por parte del replisoma bacteriano, desempeñen un papel importante en la amplitud del rango de huésped de los plásmidos RC, la promiscuidad de estos plásmidos podría estar también condicionada a la existencia de una interacción funcional entre el iniciador plasmídico y la proteína PcrA heteróloga. Para estudiar esta posibilidad y añadir más datos a los ya obtenidos con las helicasas PcrA de *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* y *B. stearothermophilus* (Anand *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2002; Soultanas *et al.*, 1999), purificamos la proteína PcrA de la estirpe R61 de neumococo y estudiamos su actividad bioquímica y su capacidad para reemplazar a PcrA de *S. aureus* (PcrASau) en la replicación *in vitro* de pT181 y en el desenrollamiento del DNA plasmídico cortado por RepC. Los resultados obtenidos mostraron que, a pesar del establecimiento de una interacción directa entre PcrASpn y RepC, la helicasa de neumococo presenta una baja procesividad y no es capaz de promover la replicación *in vitro* de pT181 al mismo nivel que PcrASau. El conjunto de los resultados que se muestran en este Capítulo nos han servido para proponer que la interacción funcional entre el iniciador de la replicación, codificado por el propio plásmido, y la helicasa PcrA de la célula hospedadora es esencial para el establecimiento y la replicación de plásmidos RC en bacterias Gram-positivas.

1. Identificación y análisis de la secuencia del gen pcrA de estreptococo y su contexto genómico en bacterias Gram-positivas.

Con la ayuda de herramientas bioinformáticas hemos identificado el gen *pcrA* en el genoma de las dos estirpes de *S. pneumoniae* secuenciadas, TIGR4 y R6 (SP1087 y spr0995, respectivamente; véase <http://genolist.pasteur.fr/StreptoPneumoList/index.html>). Para estudiar e identificar el contexto genómico de *pcrA* en varias bacterias Gram-positivas, realizamos una serie de análisis comparativos (Figura 42) usando la información que contienen las bases de datos disponibles en la página Web del NCBI (Pruitt *et al.*, 2005; Tatusova *et al.*, 1999). El contexto de *pcrA* en *S. aureus* y en *B. subtilis* es el más conservado. En estas bacterias, *pcrA* forma parte de un operón constituido por cuatro genes, homólogos en ambas especies, organizados de la siguiente manera: *pcrB-pcrA-lig-yerH*. El gen *lig* codifica una ligasa de DNA, *yerH* una proteína que podría asociarse con lípidos, y *pcrB* codifica una proteína cuya función se desconoce. En el resto de las bacterias analizadas, la situación es muy distinta. A 3' de *pcrA* hemos identificado genes aparentemente implicados en la reparación del DNA, como *radC* en *S. pneumoniae*, *mutX* y *tag* en *L. lactis*, y genes implicados en el catabolismo de la cisteína y la metionina, como *cysD* en *Streptococcus mutans* y *Streptococcus thermophilus*. Sin embargo, en *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. mutans* y *S. thermophilus*, encontramos

genes implicados en el transporte de aminoácidos y en el flujo de cationes, que se sitúan a 5' de *pcrA*, pero en dirección opuesta a éste.

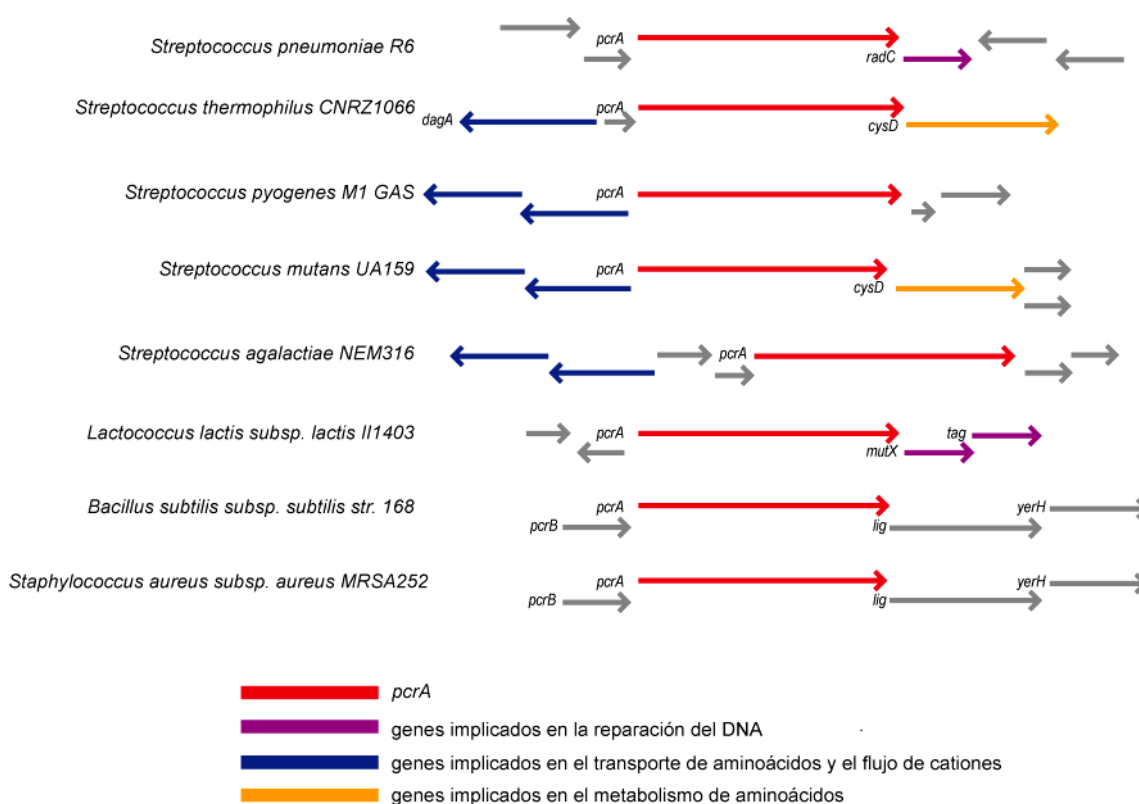


Figura 42. **Análisis comparativo del contexto genómico del gen *pcrA* en varias bacterias Gram-positivas.** PcrA de *S. pneumoniae*, que consta de 763 aminoácidos, presenta aproximadamente un 53 % de identidad con las proteínas PcrA de otros organismos Gram-positivos.

La secuencia del gen *pcrA* de *S. pneumoniae* fue analizada considerando las características conocidas del genoma de neumococo (<http://www.changbioscience.com/biotoolkit.html>). De esta manera, fuimos capaces de identificar un posible promotor (Pa) (Figura 43 A) con una región -10 extendida consenso pero sin una secuencia -35 reconocible, algo frecuente en los promotores de neumococo (Sabelnikov *et al.*, 1995). El codón de iniciación (ATG) de *pcrA*, situado a 33 pb del promotor Pa, está precedido por una secuencia Shine-Dalgarno (SD) óptima. Por último, el gen acaba con la secuencia de un posible terminador de la transcripción independiente de Rho. La longitud del marco abierto de lectura (ORF) de *pcrA* es de 2.292 nt, y la proteína correspondiente está compuesta por 763 aminoácidos, con una masa molecular teórica de 86.045 Da y un punto isoeléctrico de 5,41. El gen *radC* se localiza justo a continuación de *pcrA* y en la misma orientación (Figura 42). El producto de *radC* muestra similitud de secuencia con la proteína RadC de *E. coli*, cuya función se desconoce (Lombardo and Rosenberg, 2000). La pauta de lectura de *radC* tiene una longitud de 681 nt, y su codón de iniciación está localizado a 41 pb del codón stop de *pcrA*, lo que sugiere que el locus *pcrA-radC* podría constituir un único operón.

Además, solapando con la secuencia que podría constituir un terminador transcripcional de *pcrA*, encontramos una posible secuencia SD (Figura 43 B).

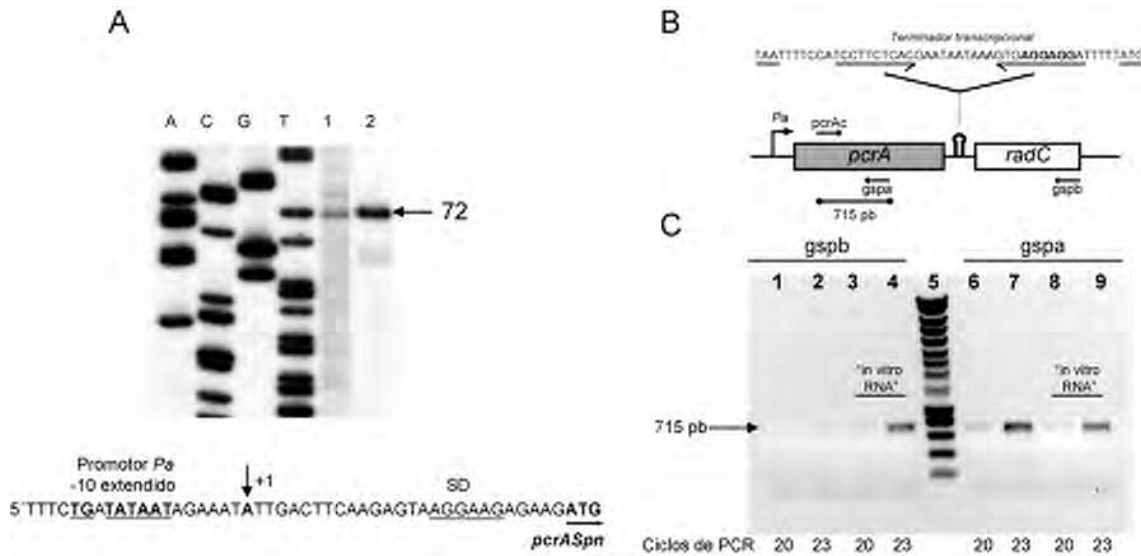


Figura 43. **Análisis transcripcional del operón *pcrA-radC* en *S. pneumoniae*.** (A) Análisis de extensión del cebador para la determinación del sitio de inicio de la transcripción de *pcrA*. Las muestras de RNA de *S. pneumoniae* (calle 1) y de *E. coli* con el plásmido pCR2.1PN (calle 2) se utilizaron para transcripción reversa con el oligo PEXT (véase apartado 2.6 de Métodos). Las calles A, C, G y T contienen los productos de las reacciones de secuencia de DNA realizadas con el mismo oligo. Como producto de la transcripción reversa se observó una banda mayoritaria de DNA extendido de 72 nt, lo que sitúa el sitio de inicio de la transcripción en el residuo A (+1) indicado por una flecha en la secuencia del DNA. También se indica la secuencia del -10 extendido del promotor Pa (en negrita y subrayado), el sitio de unión a ribosomas (SD; subrayado), y el codón de iniciación de *pcrA* (subrayado con una flecha). (B) Diagrama esquemático de la estructura genética del locus *pcrA-radC* donde se muestran las posiciones del promotor Pa y del posible terminador de la transcripción independiente de Rho (horquilla). Encima del esquema se muestra la secuencia del supuesto terminador, y las flechas convergentes indican la repetición invertida localizada antes del tracto de T. El codón de terminación de *pcrA* y el codón de inicio de *radC* están subrayados. La secuencia del posible sitio de unión a los ribosomas de *radC* se indica con letra en negrita. Los oligos utilizados para las reacciones de RT (gspa y gspb) o para PCR (pcrAc y gspa) se representan con flechas. También se muestra la localización del fragmento de 715 pb amplificado por PCR. (C) Análisis del operón *pcrA-radC* por RT-PCR. Se sintetizaron dos cDNAs que contenían *pcrA-radC* o sólo *pcrA* a partir de RNA total extraído de *S. pneumoniae* R61 con los oligos gspb y gspa, respectivamente. El dsDNA amplificado se obtuvo por PCR usando los oligos pcrAc y gspa. Se recogieron alícuotas de la mezcla de PCR después de 20 y 23 ciclos de amplificación. En las calles 1-4 se aplicaron los productos de PCR obtenidos a partir del cDNA *pcrA-radC*, mientras que en las calles 6-9 se aplicaron los obtenidos a partir del cDNA *pcrA*; las calles 3, 4, 8, y 9 contienen las reacciones de RT-PCR control, realizadas con el "in vitro RNA" *pcrA-radC* como molde; la calle 5 contiene un marcador de peso molecular de DNA (Smartladder, Eurogentec).

2. El gen *pcrA* de neumococo pertenece a un operón esencial.

Para comprobar si el locus *pcrA-radC* está organizado como un único operón en *S. pneumoniae*, realizamos ensayos de extensión del cebador y transcripción reversa-PCR (RT-PCR) usando RNA total extraído de la estirpe R61 de neumococo. Los resultados de los análisis de extensión del cebador mostraron la presencia de una banda mayoritaria de 72 nt, indicativa de un único sitio de inicio de la transcripción

(Figura 43 A, calle 1). En paralelo, realizamos el mismo ensayo con RNA total extraído de la estirpe TOP10 de *E. coli* con el plásmido pCR2.1PN (esta construcción contiene el gen *pcrA* junto con el promotor Pa), obteniendo como resultado una banda del mismo tamaño aunque de mayor intensidad, debido al incremento de la dosis génica (Figura 43 A, calle 2). El sitio +1 de inicio de la transcripción es una purina localizada 7 nt a 3' de la caja -10, lo cual es característico de los promotores bacterianos (Lewis and Adhya, 2004). Estos resultados demuestran la existencia del promotor Pa, cuya región -10 extendida es reconocida eficazmente en las bacterias *S. pneumoniae* y *E. coli*.

Para determinar si los genes *pcrA* y *radC* pertenecen al mismo operón, así como para determinar la funcionalidad del terminador transcripcional propuesto para *pcrA*, realizamos una serie de experimentos de RT-PCR. La primera etapa de estos ensayos consiste en la síntesis de cDNA mediante transcripción reversa. En nuestro ensayo sintetizamos dos cDNAs diferentes a partir de RNA total de *S. pneumoniae*, usando un oligo específico ya sea para el gen *pcrA* (gspa) o para el gen *radC* (gspb). La segunda fase consistió en la amplificación de los cDNAs mediante PCR. En este caso utilizamos dos oligos (*pcrAc* y *gspa*) que son complementarios a la región 5' y 3' de *pcrA*, respectivamente. El resultado de la reacción de PCR con ambos cDNAs fue una única banda que corresponde a un fragmento de DNA de 715 pb (Figura 43 B y 43 C), idéntico al obtenido con los mismos oligos pero usando DNA cromosómico como molde. Estos resultados muestran la existencia de mRNAs *pcrA-radC*, confirmando que ambos genes forman un operón. Los ensayos de RT-PCR fueron acompañados de reacciones de control negativo en las cuales añadimos el RNA y no realizamos la reacción de transcripción reversa. En las reacciones de PCR de los controles negativos no se detectaron fragmentos de DNA, por lo que pudimos descartar que pequeñas cantidades de DNA presentes en la preparación de RNA pudieran contribuir a la generación de los productos de amplificación observados.

Para discriminar entre los transcritos que finalizan en el posible terminador transcripcional (mRNA *pcrA*) y los que continúan a través de él (mRNA *pcrA-radC*), realizamos experimentos de RT-PCR con un enfoque semicuantitativo (McCluskey *et al.*, 2004). Como control positivo de este experimento, utilizamos RNA del locus *pcrA-radC* sintetizado *in vitro* ("in vitro RNA"). Este RNA se obtuvo por transcripción mediada por la RNA polimerasa del fago T7 (RNAP-T7) a partir de un fragmento de DNA que contenía el operón *pcrA-radC* entero bajo el control del promotor $\Phi 10$ del fago T7. Ya que RNAP-T7 no reconoce los terminadores transcripcionales propios de las RNAPs bacterianas, el RNA sintetizado corresponderá exclusivamente al transcrito bicistrónico *pcrA-radC*. Este "in vitro RNA" fue utilizado para evaluar la influencia de algunos factores, tales como la procesividad de la transcriptasa reversa o la eficiencia de hibridación de cada uno de los cebadores específicos, en el rendimiento de obtención del producto de PCR de 715 pb por amplificación del cDNA iniciado a partir de *gspa* o *gspb*. Los resultados de los experimentos de RT-PCR realizados con el "in vitro RNA" control y los oligos *gspa* o *gspb* mostraron que podíamos descartar la contribución de estos factores, ya que no se apreciaron diferencias significativas en el rendimiento del DNA de 715 pb al emplear uno u otro cebador para la síntesis del

cDNA, lo cual es un resultado predecible en un transcrito bicistrónico que no presenta regulación por atenuación transcripcional (Figura 43 C).

La aproximación de RT-PCR semicuantitativa nos permite hacer una estimación de la diferencia en los niveles de transcrito sin necesidad de recurrir a ensayos en tiempo real más costosos. Para facilitar la interpretación de los resultados hay que tener en cuenta que mientras que los mRNAs *pcrA* y *pcrA-radC* pueden generar el fragmento amplificado de 715 pb cuando la transcripción reversa es iniciada desde *gspa*, sólo el mRNA *pcrA-radC* puede rendir dicho producto de PCR si se usa *gspb* para la síntesis de cDNA. El nivel intracelular del mRNA *pcrA* resultó ser unas 20 veces mayor que el nivel intracelular del mRNA del operón *pcrA-radC* entero (Figura 43 C). Este resultado sugiere que la expresión de *radC* está sometida a regulación transcripcional por terminación prematura de la síntesis del mRNA bicistrónico. Además, a pesar de que la longitud del mRNA *pcrA* no se ha determinado, el terminador transcripcional identificado en la secuencia, y localizado entre ambos genes, se perfila como el mejor candidato para detener la mayoría de la transcripción que llega a través de *pcrA*.

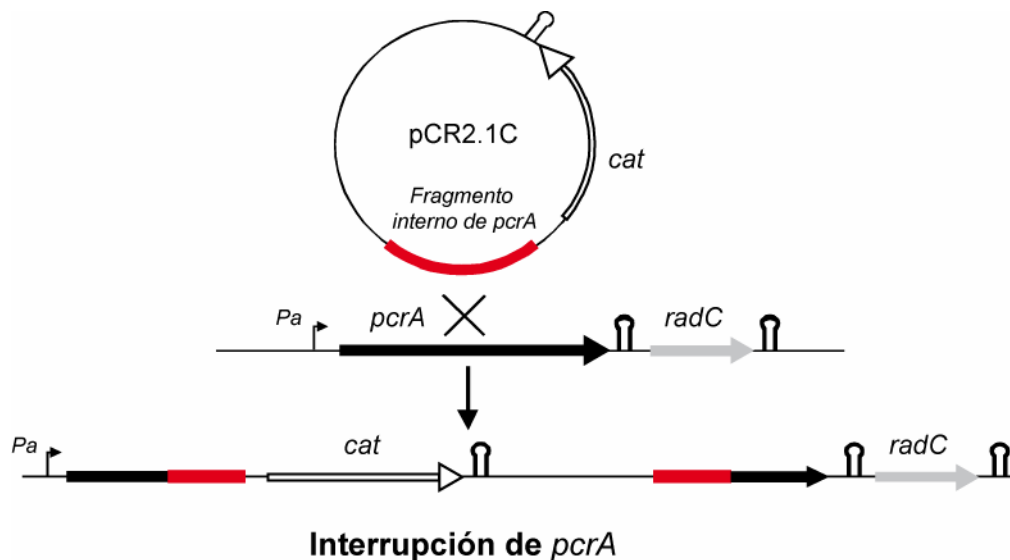


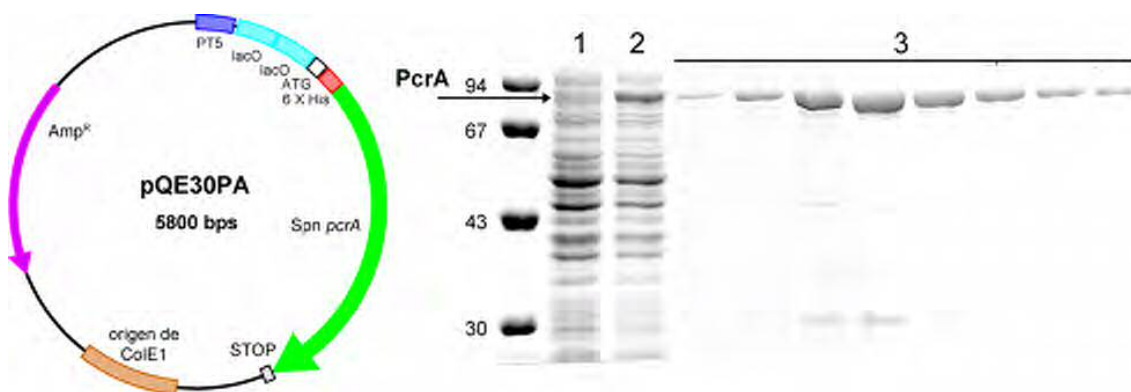
Figura 44. **Estrategia para la interrupción del gen *pcrA***. Para comprobar la esencialidad del operón *pcrA-radC* se utilizó el plásmido pCR2.1C. Este plásmido es un vector integrativo, incapaz de replicar en neumococo, que contiene el gen *cat* del plásmido pJS3 (incluido su propio promotor) como marcador de resistencia a cloramfenicol (Cm^r). Para realizar los ensayos de esencialidad se clonó un fragmento interno del gen *pcrA* en este vector, y el evento de inserción y duplicación se seleccionó en un medio de cultivo que contenía cloramfenicol. En la figura se indican el terminador de la transcripción del gen *cat* y el terminador propuesto para atenuar la transcripción de *radC*, representados con un símbolo en forma de horquilla.

Otro aspecto de la expresión del gen *pcrA* que queríamos estudiar es su esencialidad para el crecimiento celular. Como ya hemos comentado a lo largo de este Capítulo, el gen *pcrA* se ha descrito como esencial en las bacterias Gram-positivas *B. subtilis* y *S. aureus* (Iordanescu, 1993b; Petit *et al.*, 1998). Para analizar la esencialidad del operón *pcrA-radC* empleamos una estrategia de reemplazamiento génico desarrollada para *S. pneumoniae* (López *et al.*, 1982). Esta estrategia se basa

en la utilización de un vector integrativo que no replica en neumococo y que introduce un marcador de selección. Las construcciones que hemos realizado para este fin se basan en el vector pCR2.1C (véase el esquema en Figura 44), que introduce en el cromosoma el marcador de resistencia a cloramfenicol. En este vector se clonaron por separado dos fragmentos diferentes del gen *pcrA*: un fragmento interno del gen (que da lugar al plásmido pCR2.1C3, diseñado para interrumpir el gen) y un fragmento que incluye el promotor *Pa* pero que carece del extremo 3' de *pcrA* (que genera el plásmido pCR2.1C1, diseñado para reconstituir una copia intacta del gen y que, por tanto, fue utilizado como control positivo). Al interrumpir *pcrA* no observamos colonias resistentes a cloramfenicol (Cm^r), lo que supone una indicación de la esencialidad de *pcrA* y/o de *radC* (en el caso de que la interrupción de *pcrA* tenga un efecto polar). En el experimento control, en el que la expresión a partir del promotor *Pa* no estaba afectada y conseguíamos reconstituir una copia del operón *pcrA-radC*, se obtuvieron unas 20.000 ufc (unidades formadoras de colonias) Cm^r por ml de cultivo competente y por μg de DNA.

Para evaluar el efecto polar que la interrupción de *pcrA* pudiera tener sobre la expresión de *radC*, construimos el vector pCR2.1C2, que incluye el extremo 3' de *pcrA* (pero carece del promotor *Pa* y del extremo 5' del gen). El evento de inserción-duplicación con esta construcción dejaría una copia de *pcrA* intacta pero afectaría a la expresión de *radC* desde el promotor *Pa*. De nuevo no pudimos detectar colonias Cm^r , un hecho que demuestra la esencialidad de *radC*. A pesar de que estos resultados confirman el efecto polar de la interrupción de *pcrA*, no podemos descartar que este gen también sea esencial para la célula. Sin embargo, en un estudio dirigido a identificar genes esenciales de la estirpe Rx-1 de neumococo, y usando una estrategia de reemplazamiento génico similar, se mostró que *pcrA* no era esencial (Thanassi *et al.*, 2002). Se piensa que PcrA de *B. subtilis* desempeña una función esencial contrarrestando la toxicidad de las proteínas de los sistemas de recombinación (Petit and Ehrlich, 2002). La presencia de mutaciones en los genes que modulan la actividad de RecA parece suprimir la letalidad de las mutaciones de *pcrA* en estas bacterias. Por tanto, es posible que la estirpe Rx-1 de neumococo contenga mutaciones en los genes moduladores de RecA, propiciando que *pcrA* no sea esencial. Aunque los resultados obtenidos no nos permiten determinar de manera inequívoca la esencialidad de *pcrA* en la estirpe de neumococo R61, es posible que las mutaciones supresoras también estén presentes en la estirpe utilizada en nuestros experimentos. En el trabajo con la estirpe Rx-1 (Thanassi *et al.*, 2002), la interrupción de *pcrA* no reveló la esencialidad de *radC*. Puede ser que la organización de los genes *pcrA* y *radC*, y su contexto genético, sea diferente en las estirpes R61 y Rx-1. Sin embargo, es muy posible que la capacidad para evidenciar la esencialidad de *radC* mediante inserción de un vector integrativo en *pcrA* esté relacionada con la magnitud del efecto polar causado sobre *radC* en uno u otro caso. La estrategia de reemplazamiento génico que hemos utilizado maximiza el efecto polar ya que el gen *cat*, responsable de la resistencia a cloramfenicol y clonado con su propio terminador transcripcional, fue insertado en la misma dirección que el fragmento del gen *pcrA* (Figura 44). En la práctica esto significa que, después del evento de inserción-duplicación, la transcripción de los

Para purificar PcrA de neumococo clonamos en el vector de expresión pQE30 (Quiagen) un fragmento obtenido por PCR, a partir de DNA cromosómico de *S. pneumoniae*, que contenía el marco abierto de lectura de *pcrA*. La construcción resultante, pQE30PA, generó una fusión traduccional de PcrASpn con una etiqueta de seis residuos de histidina (His₆) en el extremo amino de la proteína (Figura 45). Para purificar esta proteína, que en adelante llamaremos His-PcrASpn, indujimos su producción en la estirpe M15 de *E. coli* y realizamos cromatografía de afinidad empleando una resina de níquel (véase apartado 2.2 de Métodos). Para recuperar la proteína unida a la resina, aplicamos una solución que contenía 0,2 mM de imidazol. Las fracciones (aproximadamente 0,2 ml) que íbamos recogiendo eran analizadas por electroforesis en geles desnaturizantes PAA/SDS. La concentración de His₆-PcrASpn en las fracciones elegidas (aquellas en las que la pureza de His₆-PcrASpn era mayor que un 90%) era de aproximadamente 0,2 mg/ml. El peso molecular de la proteína purificada, estimado en función de su movilidad electroforética en geles de PAA/SDS, era de aproximadamente 86 kDa, siendo compatible con el tamaño predicho del producto del gen *pcrA* (763 aminoácidos). Esta preparación de proteína His₆-PcrASpn se utilizó en los ensayos de caracterización de la actividad helicasa de PcrASpn, así como en los experimentos de replicación *in vitro* del plásmido pT181.



126

inducir e inducido, respectivamente. El peso molecular de His₆-PcrASpn es de unos 86 kDa, y es consistente con el tamaño del gen *pcrA* de neumococo.

Durante la realización de esta tesis hemos desarrollado un protocolo de purificación de PcrASpn sin la etiqueta His₆. El objetivo que perseguíamos era obtener proteína con la concentración y pureza necesarias para los estudios estructurales mediante cristalografía y difracción de rayos X. Aunque las preparaciones de proteína obtenidas por este método no se han llegado a utilizar, merece la pena comentar algunos hallazgos interesantes obtenidos durante el desarrollo de este protocolo. El vector de expresión que elegimos fue el plásmido pCR2.1 (Invitrogen), donde la expresión de *pcrA* estaba controlada por el promotor $\Phi 10$ del fago T7. En un principio intentamos clonar un fragmento que, además de contener el gen *pcrA*, también incluyera el promotor Pa. Sin embargo, todas las construcciones que incluían este promotor acumulaban mutaciones en distintas regiones del gen *pcrA*. Finalmente, pudimos obtener un clon con la secuencia de *pcrA* intacta incluyendo únicamente la posible secuencia SD. La sobreproducción de PcrASpn se realizó en la estirpe BL21(DE3) de *E. coli*. Los cultivos (4 l) de células que contenían la construcción, pCR2.1PN, eran inducidos en la fase exponencial de crecimiento ($DO_{600} = 0,5$) con 1 mM de IPTG, y tratados durante 60 min más con rifampicina. Antes de proceder con las siguientes etapas de purificación, identificamos la banda de proteína que suponíamos era PcrA mediante la secuenciación de su extremo amino (no se muestra). Es importante realizar la inducción a 30 °C, en lugar de a 37 °C que es la temperatura de crecimiento de *E. coli*, ya que esto evita la formación de agregados de proteína y mejora su solubilidad. Las células recogidas por centrifugación se resuspendieron en tampón A suplementado con 1 M de NaCl, y se rompieron mediante su paso por una célula de presión tipo French. El lisado celular se sometió a una serie de procesos de fraccionamiento que incluyeron centrifugación, para eliminar los restos celulares, precipitación de los ácidos nucleicos con PEI, y finalmente precipitación de proteínas con sulfato amónico a una saturación del 70%. El precipitado proteico fue resuspendido en tampón A suplementado con 1 M de NaCl, y dializado frente al mismo tampón A pero sin sal. En estas condiciones conseguíamos la precipitación selectiva de más del 90% del contenido en PcrASpn. Aunque había otras proteínas que acompañaban a PcrA en la precipitación, en esta etapa obteníamos un buen rendimiento de purificación. El precipitado de PcrASpn era recogido por centrifugación y disuelto en tampón A con 300 mM de NaCl. La purificación continuó con una cromatografía de afinidad con una resina que contiene el ligando “cibacom”, que es capaz de retener proteínas que unen cofactores como el NADH o ATP. La elución de PcrASpn se realizó mediante un gradiente lineal desde 0,3 hasta 1,5 M de NaCl. Desde las primeras etapas de la purificación pudimos apreciar la aparición de una segunda banda de proteína, que migraba por debajo de la correspondiente a PcrA, y que parecía provenir de la proteólisis de la banda mayoritaria. La adición de inhibidores de proteasas en las muestras de proteína parecía reducir este proceso aunque no eliminarlo por completo. Ambas proteínas presentaban picos de elución distintos en la cromatografía de afinidad. Gracias a esto pudimos separar ambas proteínas y secuenciar su extremo amino. Tal y como

sospechábamos, la banda inferior correspondía a la proteína PcrA que había perdido unos 30 residuos de su región amino terminal. Por tanto, esta región de la estructura de PcrASpn, que es susceptible de ser separada del resto por la acción de proteasas, podría suponer un dominio estructural diferente cuya función trataremos de determinar en un futuro.

4. La actividad ATPasa de PcrASpn es estimulada por ssDNA.

Para confirmar que la proteína purificada His₆-PcrASpn era enzimáticamente activa, medimos su actividad ATPasa mediante el análisis de la hidrólisis de [α -³²P]ATP y [α -³²P]dATP como se describe en el apartado 2.4.1 de Métodos. Los resultados mostraron que His₆-PcrASpn hidroliza dATP y ATP a niveles similares (Figura 46; la hidrólisis de ATP no se muestra). Además, al igual que las proteínas PcrA de *S. aureus*, *B. anthracis*, y *B. cereus*, la actividad ATPasa de His₆-PcrASpn aumenta significativamente por la adición de DNA de cadena sencilla a la mezcla de reacción (Figura 46). La actividad ATPasa de PcrASpn y de PcrASau es comparable (Anand *et al.*, 2005).

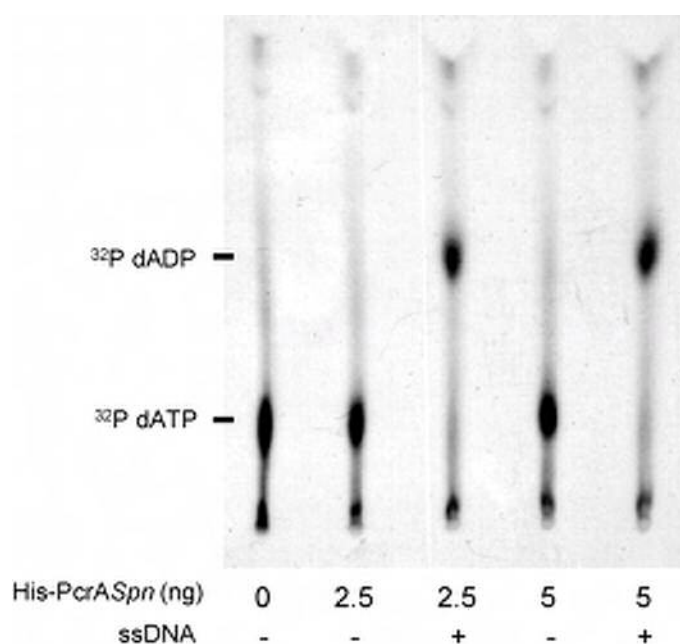


Figura 46. **Actividad ATPasa de His₆-PcrASpn.** La actividad dATPasa de la helicasa de neumococo se determinó por la medida de la hidrólisis de [α -³²P]dATP. Las reacciones se realizaron en tampón TEKEM 1X con 1 μ Ci de [α -³²P]dATP y diferentes concentraciones de His₆-PcrASpn. La capacidad ATPasa de His₆-PcrASpn se activó en presencia de 100 ng de un ssDNA de 52 nt. Los productos de la hidrólisis de [α -³²P]dATP se analizaron mediante cromatografía en capa fina.

5. Interacciones proteína-proteína entre PcrASpn y RepC.

La interacción específica entre PcrASau y RepC tiene una importancia decisiva para el desenrollamiento del DNA de pT181 durante el proceso de iniciación de la replicación (Chang *et al.*, 2002). Una vez que la interacción física entre PcrASau y

RepC había sido mostrada (Chang *et al.*, 2002), decidimos comprobar si His₆-PcrASpn también era capaz de interaccionar físicamente con RepC. Con este fin realizamos experimentos de “pull-down”, aprovechando la presencia de diferentes etiquetas en las proteínas PcrA y RepC. El lisado celular de un cultivo de *E. coli* en el que se había inducido la producción de la proteína de fusión MBP (proteína de unión a maltosa)-RepC se incubó durante 1 h a 4 °C con una resina compuesta por amilosa. Tras este periodo de incubación, se realizaron varios lavados con tampón A para eliminar las proteínas que no se habían adsorbido a la resina. A continuación, añadimos proteína His₆-PcrASpn purificada a la mezcla de MBP-RepC unida a la resina de amilasa e incubamos durante 1 h a 4 °C. Como en el paso anterior volvimos a lavar la resina con tampón A, y las proteínas unidas fueron extraídas directamente con tampón de carga SLB y analizadas por electroforesis en geles de PAA/SDS. Los análisis siguientes se realizaron mediante “Western-blot” con anticuerpos monoclonales frente a MBP y a la etiqueta His₆. Estos ensayos mostraron que, como se esperaba, la proteína de fusión MBP-RepC estaba unida a la resina de amilosa (Figura 47, calle 1). Además, mientras que His₆-PcrASpn no se unía a la resina de amilosa preincubada con BSA, sí que aparecía retenida por la misma resina en la que habíamos unido MBP-RepC (Figura 47, calle 4). Estos resultados indican que His₆-PcrASpn puede interaccionar físicamente con RepC. Además, la fuerza de la interacción era comparable a la de PcrASau y RepC (Anand *et al.*, 2005).

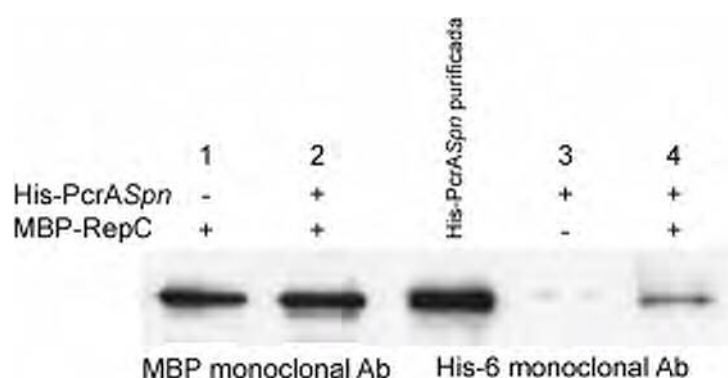


Figura 47. **Análisis de la interacción entre His₆-PcrASpn y RepC.** La interacción física entre las proteínas PcrASpn y RepC se analizó mediante experimentos de “pull-down” que se describen en el apartado 2.11 de Métodos. Las fracciones extraídas de la resina de amilosa (con [+] o sin [-] MBP-RepC unida) fueron incubadas con anticuerpos monoclonales anti-MBP o anti-His₆. En el experimento control (calle 3) sin MBP-RepC unida, la resina de amilosa se incubó con un 1 % de BSA. En la calle “His-PcrASpn purificada” se aplicaron 0,2 µg de proteína purificada directamente en el gel.

6. Actividad helicasa y de unión a DNA de PcrASpn.

Con el fin de caracterizar la helicasa PcrA de neumococo, realizamos una serie de ensayos para determinar su actividad helicasa y su capacidad de unión a varios oligos con diferentes conformaciones (Figura 48). Los sustratos consistían en dsDNAs con extensiones de oligo(dT) en los extremos 3' o 5' (sustratos A y B, respectivamente), y en dúplex parciales en los que las regiones monocatenarias

podían formar estructuras secundarias, incluyendo (i) una horquilla con una extensión monocatenaria de 6 nt en el extremo 5' y un nucleótido desapareado en el extremo 3' de la cadena complementaria (sustrato C) y (ii) una horquilla con una extensión monocatenaria de 6 nt en el extremo 3' y un nucleótido desapareado en el extremo 5' de la cadena complementaria (sustrato D). Estos últimos sustratos mimetizan el *dso* de pT181, ya que las regiones monocatenarias de los extremos 3' y 5' corresponderían al elemento IR-II, que puede asumir una estructura tipo tallo-lazo (Dempsey *et al.*, 1992b; Jin *et al.*, 1997b; Jin and Novick, 2001).

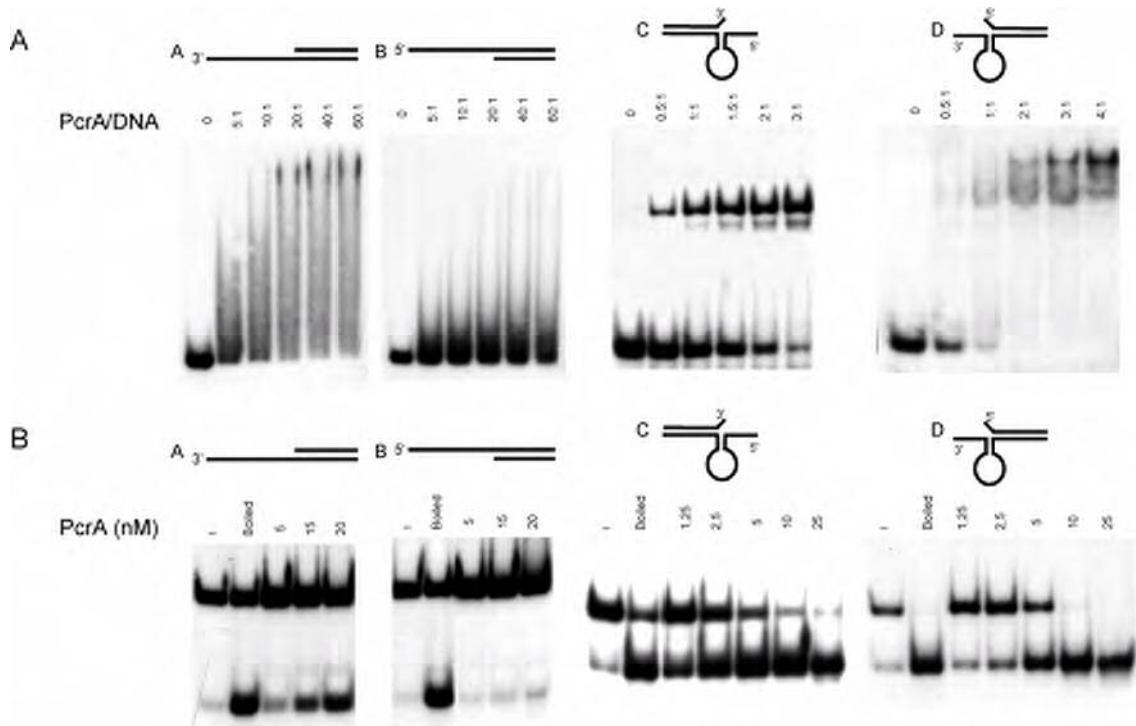


Figura 48. Actividad helicasa y de unión a DNA de la helicasa PcrASpn. (A) PcrASpn muestra especificidad de unión por sustratos de DNA que contienen una estructura tipo tallo-lazo en su extremo 3' o 5'. En los experimentos de retardo en gel se incubó His₆-PcrASpn con los cuatro sustratos de DNA (A, B, C y D) marcados con [³²P] en su extremo 5', a diferentes relaciones molares proteína:DNA. Los complejos proteína-DNA se analizaron por electroforesis en geles nativos de PAA al 6 %. (B) PcrASpn mostró actividad helicasa bipolar 5'→3' y 3'→5'. En los ensayos de actividad helicasa se incubó His₆-PcrASpn con los sustratos marcados radiactivamente que contienen dúplex parciales y tallos oligo(dT) en 3' o en 5' (sustratos A y B), o con sustratos que contienen regiones monocatenarias estructuradas en 5' o en 3' (sustratos C y D). Los productos de la reacción helicasa se analizaron por electroforesis en geles nativos de PAA al 6 %. En las calles marcadas como "boiled" se aplicaron los sustratos de DNA correspondientes desnaturalizados.

La actividad de unión a DNA se detectó mediante ensayos de retardo en geles nativos de PAA. Al incubar His₆-PcrASpn con los sustratos A y B observamos que la proteína apenas se unió al sustrato B, mientras que la unión al sustrato A generó niveles detectables de complejos proteína-DNA. Sin embargo, estos complejos mostraron una migración difusa en los geles de PAA, posiblemente como consecuencia de la baja estabilidad de la unión de la proteína al DNA (Figura 48 A). La presencia de regiones de intersección entre ssDNS y dsDNA no parece, pues,

suficiente para generar complejos estables entre His₆-PcrASpn y el DNA, aunque la unión de la proteína al sustrato A con el tallo monocatenario en 3' es más eficiente que al sustrato B. La unión de His₆-PcrASpn a los sustratos C y D resultó ser mas estable, y los complejos proteína-DNA migraron como bandas discretas en ambos casos (Figura 48 A). Aunque la capacidad de His₆-PcrASpn para unirse a los sustratos con la región monocatenaria en 3' o 5' plegada es similar, la proteína presenta una ligera preferencia por unirse al sustrato D.

La actividad helicasa de His₆-PcrASpn se evaluó en experimentos de desenrollamiento del DNA. Mediante electroforesis en geles nativos de PAA pudimos separar el sustrato de DNA y el producto de la reacción helicasa, que consiste en la cadena de DNA marcada radiactivamente (Figura 48 B). His₆-PcrASpn presentó actividad de desenrollamiento sobre el sustrato A, aunque no fue capaz de separar significativamente el sustrato B. Por tanto, la actividad de His₆-PcrASpn sobre dúplex de DNA con tallos monocatenarios es predominante en la dirección 3'→5'. Los ensayos de actividad helicasa realizados con los sustratos C y D mostraron que His₆-PcrASpn es capaz de desenrollar ambos sustratos, aunque mostró una eficacia ligeramente mayor al actuar sobre el sustrato con el tallo estructurado en la región 5'. Estos resultados demuestran que His₆-PcrASpn posee actividad helicasa bipolar en ambas direcciones, 3'→5' y 5'→3', y que presenta una eficacia similar para desenrollar sustratos de DNA bicatenario que presentan en sus extremos (3' o 5') regiones de cadena sencilla que pueden plegarse para formar estructuras secundarias.

7. PcrASpn no puede desenrollar extensivamente el DNA de pT181 cortado por RepC.

Como ya se ha mencionado a lo largo de esta tesis, la replicación RC de pT181 se inicia por la actividad del iniciador RepC, que realiza un corte en el *dso* y se queda unido covalentemente al extremo 5' del DNA (Koepsel *et al.*, 1985; Thomas *et al.*, 1988). El nuevo extremo hidroxilo en 3' sirve como sustrato para la síntesis de DNA por la DNA polimerasa, siendo necesaria la actividad helicasa de PcrA en el transcurso de esta reacción (Khan, 2003; Khan, 2005). La unión de RepC al *dso* de pT181 va acompañada por el reclutamiento de PcrA (entre otras proteínas de la célula hospedadora), que interacciona directamente con RepC (Chang *et al.*, 2002). La interacción entre las proteínas iniciadoras Rep de los plásmidos RC y las helicasas PcrA heterólogas podría constituir un factor determinante para la amplitud del rango de huésped de estos plásmidos. Para tener un conocimiento más amplio de la interacción entre el iniciador RepC y las helicasas PcrA heterólogas, realizamos una serie de ensayos en los que PcrASau fue reemplazada funcionalmente por su homóloga de neumococo. Uno de estos ensayos consiste en iniciar el desenrollamiento *in vitro* de DNA plasmídico de pT181. Para ello, incubamos DNA superenrollado de pT181 con RepC y una de las dos helicasas, y analizamos el desenrollamiento en geles de agarosa con BrEt. Los resultados (Figura 49) mostraron que el desenrollamiento mediado por PcrASau del DNA cortado por RepC da lugar a una banda de migración más rápida, que corresponde a una forma de DNA desenrollado [forma U, según la

denominación de los autores en (Chang *et al.*, 2002)] Aunque esta forma U no corresponde a DNA de pT181 completamente desenrollado, sí se ha observado que contiene amplias regiones de DNA desapareado que son sensibles a la digestión por la nucleasa S1 (Chang *et al.*, 2002). Estos ensayos también mostraron que el desenrollamiento iniciado por PcrASau en el corte generado por RepC requiere la presencia de la proteína iniciadora unida covalentemente al DNA (Chang *et al.*, 2002). La utilización de mutantes de RepC en los que las actividades de corte y de unión específica a DNA estaban desacopladas, permitió determinar que tanto el corte del DNA como la interacción estable y no covalente entre RepC y el origen de pT181 son necesarias para dirigir a PcrA hacia el sitio de corte e iniciar así la separación de las dos cadenas de DNA.

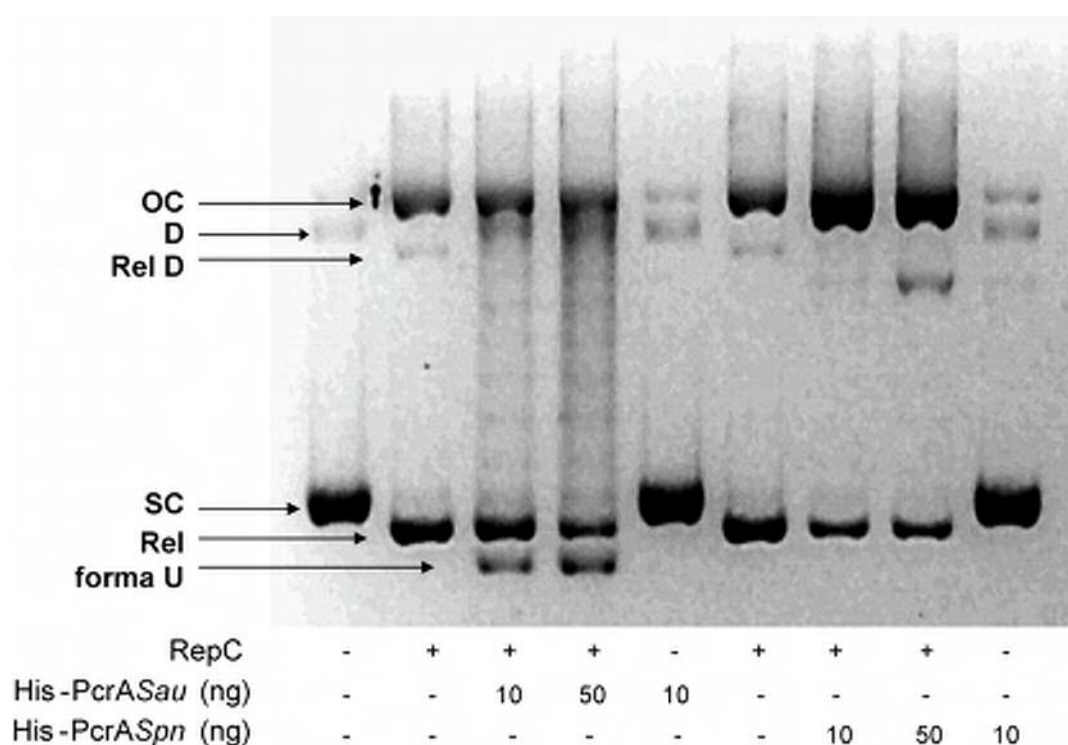


Figura 49. **Actividad de PcrASpn en el desenrollamiento de DNA plasmídico.** En estos ensayos, realizados como se describe en el apartado 2.4.3 de Métodos, se incubó DNA superenrollado de pT181cop608 (mutante de alto número de copias) en presencia (+) o en ausencia (-) de RepC y con diferentes cantidades de His₆-PcrASau o de His₆-PcrASpn. Los productos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1 % en presencia de BrEt. OC, DNA circular abierto; D, dímeros de DNA superenrollado; RelD, dímeros de DNA covalentemente cerrado y relajado; SC, monómeros de plásmido superenrollado; Rel, monómeros de DNA covalentemente cerrado y relajado; forma U, DNA plasmídico desenrollado.

Cuando utilizamos la helicasa PcrASpn para iniciar el desenrollamiento *in vitro* del DNA de pT181, observamos la aparición de una banda con una migración ligeramente más rápida que la correspondiente a la forma OC (círculos abiertos) (Figura 49). Esta banda, que era sensible a la nucleasa S1 (no se muestra), podría corresponder a DNA de la forma OC con un grado de desenrollamiento limitado (Chang *et al.*, 2002). En contraposición con el resultado obtenido con PcrA de

neumococo, la presencia de las helicasas PcrA de *B. cereus* (PcrABcer) y *B. anthracis* (PcrABan) en la reacción de desenrollamiento *in vitro* de pT181 sí produjo la aparición de la forma U (Anand *et al.*, 2004), la cual refleja un desenrollamiento del DNA más extenso. Así pues, parece que mientras que PcrABcer y PcrABan fueron capaces de establecer una interacción funcional con RepC, la helicasa de neumococo falló en este sentido y no fue capaz de continuar el desenrollamiento que había iniciado.

8. La capacidad de His-PcrASpn para promover la replicación *in vitro* de pT181 es limitada.

La incapacidad de PcrASpn para desenrollar una extensión amplia del DNA de pT181 podría estar relacionada con las características de su actividad helicasa. La actividad helicasa de PcrASau es unas 10 veces más fuerte en sustratos bicatenarios parciales con tallos monocatenarios estructurados en el extremo 5', que con sustratos similares en los que el tallo monocatenario estructurado corresponde al extremo 3' (Anand and Khan, 2004). Por otra parte, PcrASpn sólo muestra una ligera preferencia por desenrollar dúplex parciales con el tallo monocatenario estructurado en 5' (Figura 48 B). Por tanto, y dado que la actividad helicasa de PcrASpn es similar a la de la helicasa de estafilococo, es posible que la limitación en el desenrollamiento esté relacionada con la procesividad del complejo helicasa-iniciador'. En este sentido, es probable que la interacción con el iniciador heterólogo RepC no confiera a PcrASpn una capacidad de desenrollamiento eficaz.

Puesto que la interacción de PcrASpn con otros componentes de la maquinaria replicativa de *S. aureus* podría paliar esta deficiencia y permitir la replicación de pT181 mediada por la helicasa, decidimos comprobar si la helicasa heteróloga PcrASpn es capaz de asistir la replicación de pT181 *in vitro*. Estos ensayos de replicación *in vitro* se realizaron con extractos celulares preparados a partir de la estirpe RN4220 de *S. aureus* y del mutante *pcrA3*, que es inactivo en la replicación de pT181 (Chang *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2002). La replicación de pT181 en los extractos de la estirpe silvestre se detectó por la incorporación de nucleótido radiactivo en el DNA de nueva síntesis. Así se pudo observar la aparición de bandas de DNA radiactivo correspondientes a las formas SC y OC del DNA plasmídico, así como intermedios replicativos (Figura 50 A). Al incubar DNA de pT181 con los extractos celulares de la estirpe *pcrA3* de *S. aureus* se observaron algunas bandas de intensidad débil, cuya procedencia se debe probablemente a la incorporación de algunos nucleótidos radiactivos como consecuencia de la actividad de corte de RepC o de otros agentes modificantes del DNA presentes en el extracto celular. Coincidiendo con los resultados observados anteriormente (Chang *et al.*, 2002), la adición de la proteína His₆-PcrASau al extracto *pcrA3* restableció la replicación de pT181. En comparación, la adición de His₆-PcrASpn al mismo extracto *pcrA3* confirió una replicación limitada de pT181, con una síntesis de DNA mucho menor que con la helicasa homóloga PcrASau (Figura 50 A).

La replicación *in vitro* de pT181, mediada por la participación de la helicasa PcrA, también se analizó en un sistema más sencillo constituido por el DNA

plasmídico, el iniciador RepC, las helicasas PcrASau o PcrASpn, SSB de *S. pyogenes* (Bruck and O'Donnell, 2000), y la DNA polimerasa DnaE, homóloga de la polimerasa PolC de *E. coli*, aislada del microorganismo Gram-positivo *S. pyogenes* (Bruck and O'Donnell, 2000). Como control positivo de la replicación independiente de la actividad helicasa utilizamos DNA monocatenario de M13mp18 hibridado con un único cebador. El resultado de estos ensayos (Figura 50 B), que fue similar al obtenido con los extractos replicativos celulares, confirmó la incapacidad de PcrASpn para proporcionar unos niveles de replicación similares a los de PcrASau. Debido a la falta de otras proteínas del replisoma, que intervienen en la generación de las formas SC del plásmido, el DNA de nueva síntesis aparece como intermedios replicativos y formas plasmídicas OC.

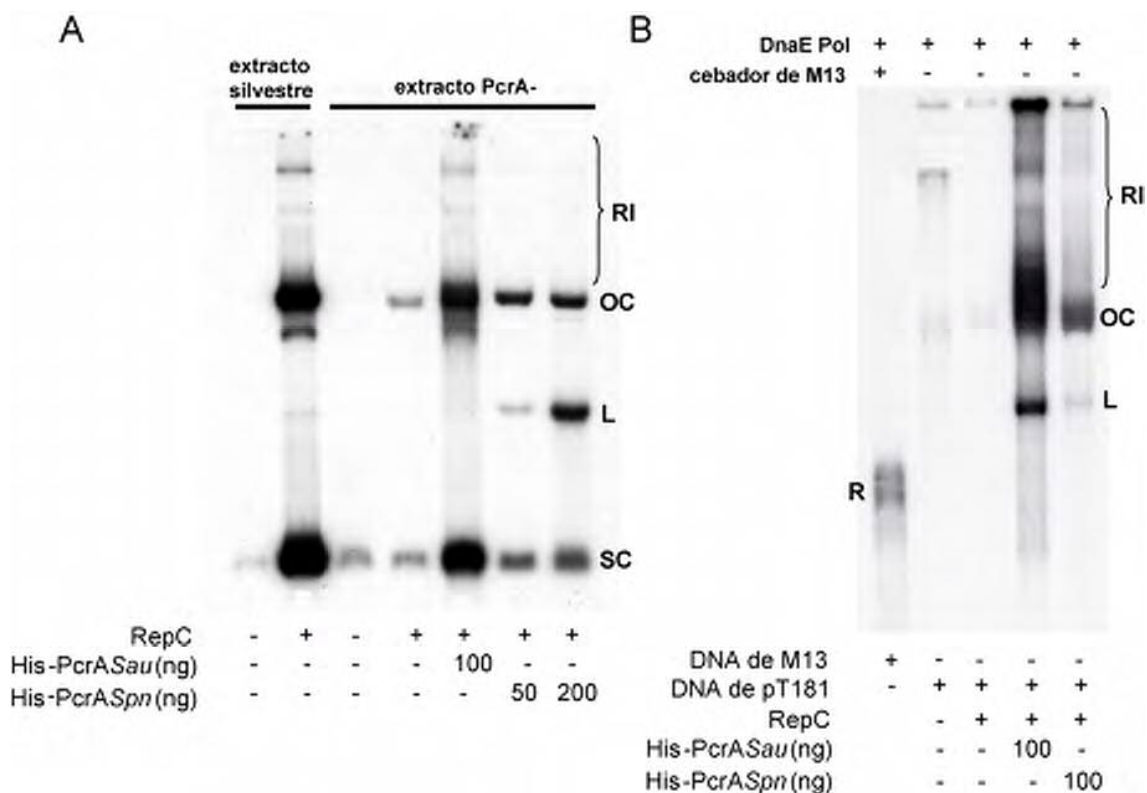
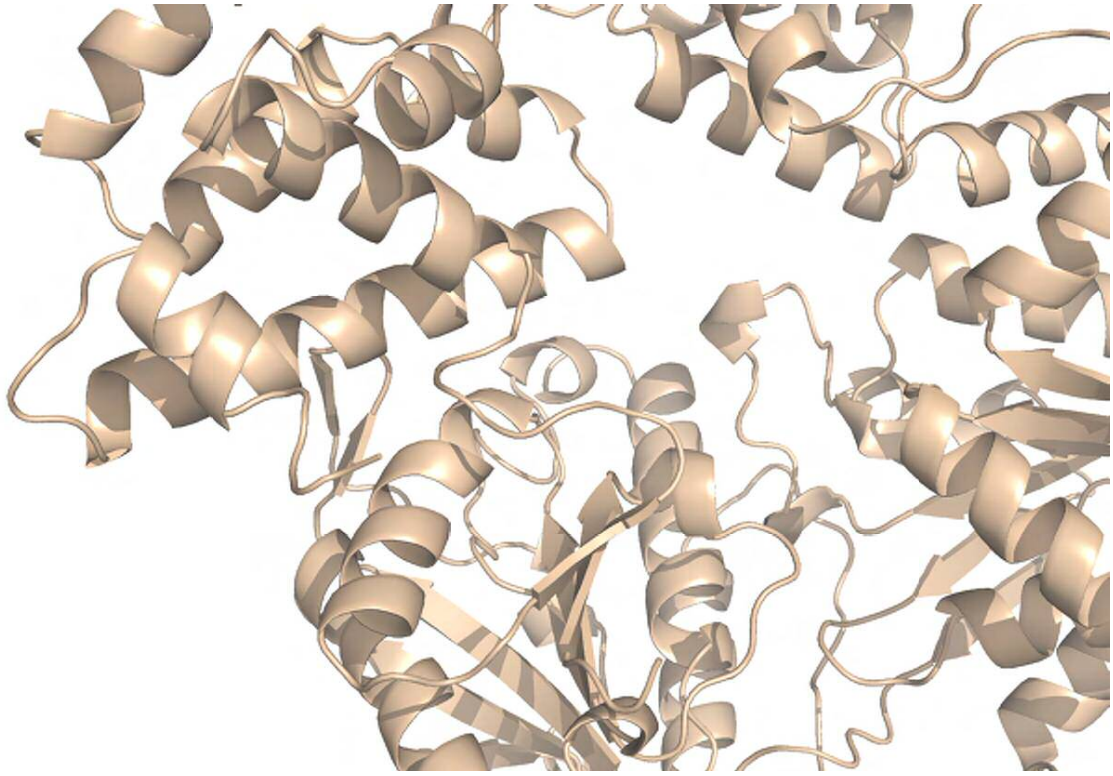


Figura 50. **Replicación *in vitro* de pT181.** (A) Los experimentos de replicación *in vitro* de pT181 se realizaron con RepC y extractos celulares de la estirpe silvestre de *S. aureus* (extracto silvestre) y del mutante *pcrA3* (extracto PcrA⁻), y diferentes cantidades de las helicasas PcrA. En la figura se indica la posición en el gel de las formas plasmídicas correspondientes al DNA superenrollado (SC), al DNA lineal (L), al DNA circular abierto (OC), y a los intermedios de la replicación (RI). (B) Replicación *in vitro* de pT181 con la DNA polimerasa DnaE. Los ensayos de replicación se realizaron ya sea con DNA de M13 hibridado con un único cebador, o bien con DNA de pT181 en presencia de RepC y alguna de las dos helicasas PcrASau o PcrASpn. En las reacciones en las que se incubó el DNA de pT181, junto con la polimerasa DnaE, en ausencia del resto de proteínas, o en presencia de RepC pero sin PcrA, no se observó una síntesis significativa de DNA. En la figura se indica la posición de las formas plasmídicas correspondientes al DNA circular abierto (OC), al DNA lineal (L), y a los intermedios de la replicación (RI). También se indica la posición del DNA de M13 de nueva síntesis (R).



DISCUSIÓN

RepB interacciona con dos regiones distantes en el dso.

Los ensayos de unión y el análisis de los contactos de RepB con su DNA diana muestran que RepB interacciona con dos regiones diferentes, y separadas físicamente, dentro del *dso* de pMV158. RepB presenta mayor afinidad por la secuencia DDR (que constituye el locus *bind*) que por el locus *nic* (el cual incluye la secuencia PDR y el elemento IR-I, que lleva el sitio específico de corte). La diferente afinidad de RepB por ambas regiones del *dso* estaría relacionada con la baja estabilidad del complejo RepB-*nic* (vida media menor de 1 min) en comparación con la estabilidad del complejo RepB-*bind*, que presenta una vida media de 18 min. Esta característica también se ha observado en el iniciador RepD del plásmido de estafilococo pC221 (perteneciente a la familia de pT181), que presenta mayor afinidad de unión por su correspondiente locus *bind* que por la región donde corta específicamente el DNA (Thomas *et al.*, 1995).

Tras la unión a su sitio primario, el locus *bind*, RepB se cargaría en el locus *nic*, al que se une con menos afinidad. La carga y el posicionamiento de la proteína en el locus *nic* facilitaría la extrusión del cruciforme IR-I y, como consecuencia, la proteína se encontraría preparada para iniciar la replicación mediante la introducción de un corte en el dinucleótido 5'-GpA-3' dentro de la secuencia específica. Aunque la replicación *in vivo* de pMV158 requiere la presencia de las DDR, se ha observado que *in vitro* RepB es capaz de mediar la reacción de corte/cierre del DNA en oligos monocatenarios que sólo contienen la secuencia específica de corte, así como en DNA superenrollado carente de las DDR o bien conteniendo secuencias PDR y DDR distintas de las de pMV158 (Moscoso *et al.*, 1995b). Por tanto, el único requerimiento de RepB para su actividad nucleolítica es que la secuencia que contiene el sitio específico de corte esté en forma de cadena sencilla. En DNA superenrollado, este requerimiento se consigue mediante la extrusión del cruciforme IR-I, que es promovida por la unión de RepB al locus *nic*. Previamente se había demostrado, mediante mapeo con la endonucleasa S1, que la horquilla IR-I (véase la Figura 24) es una de las tres estructuras secundarias principales que están extruidas a 10 °C en el DNA superenrollado de un derivado de pMV158. En cambio, a 37 °C sólo se pudo detectar con claridad la extrusión de una estructura secundaria localizada delante del *dso* del plásmido (alrededor de la coordenada 170 de pMV158) (Puyet *et al.*, 1988). Por lo tanto, a la temperatura fisiológica del hospedador de pMV158 (37 °C), la extrusión de la horquilla IR-I requeriría la unión de RepB al locus *nic* y, como consecuencia, el inicio de la replicación sería debido a la unión específica de RepB. Además, el ensamblaje del resto de componentes, proporcionados por la célula hospedadora, que constituirían el replisoma [la helicasa PcrA (Chang *et al.*, 2002), la proteína de unión a DNA de cadena sencilla, la DNA polimerasa I (Díaz *et al.*, 1994), y la DNA polimerasa III], podría estar facilitado por la estructura transitoria generada tras la unión de RepB a ambos loci (*nic* y *bind*) y el subsecuente corte del DNA en el sitio de iniciación. Esta estructura consistiría en una región de DNA desapareada como consecuencia de la unión simultánea de RepB al locus *bind* y al extremo 5' generado por el corte, una vez que éste ha anulado la extrusión del cruciforme IR-I. Esto supone la exposición de una

región de ssDNA sobre la que se pueden ensamblar algunos de los componentes del replisoma como la helicasa y las proteínas de unión a ssDNA.

Los contactos de RepB con el locus *nic*, aunque son diferentes según se trate de DNA lineal o superenrollado, involucran secuencias de DNA que estarían localizadas en la base o dentro de la cruciforme IR-I, donde la proteína ejerce su actividad de corte (Figuras 16 y 24). Por lo tanto, este sitio secundario de unión de RepB sería la región del DNA donde se espera que se una la molécula de RepB que catalizará la iniciación de la replicación. Las proteínas Rep de los plásmidos de la familia de pT181 muestran contactos con el lado 3' de la horquilla de DNA que contiene el sitio de corte y con una repetición invertida adyacente que constituye la región específica *bind* (Koepsel *et al.*, 1986; Thomas *et al.*, 1988). De esta manera, el sitio secundario de unión de RepB tiene la misma organización relativa al sitio de corte que la región específica *bind* de los plásmidos de la familia de pT181. La estructura cruciforme que contiene el sitio de corte en el *dso* de pT181 constituye un sitio minoritario de sensibilidad a nucleasa S1 (Noirot *et al.*, 1990), lo que indica que su extrusión espontánea no está favorecida. Es la unión específica de RepC al *dso* la que promueve la extrusión de esta estructura (Jin *et al.*, 1997a; Noirot *et al.*, 1990), lo que supone otro elemento en común con la iniciación de la replicación de pMV158. A pesar de que los resultados obtenidos en esta tesis demuestran similitudes en el proceso de iniciación de la replicación RC de los plásmidos pT181 y pMV158, la existencia de dos sitios específicos de unión para el iniciador RepB dentro del *dso* de pMV158, y su organización relativa al sitio específico de corte, suponen una característica única de pMV158 y de los plásmidos de su familia. Por otra parte, aunque las proteínas iniciadoras de ambos plásmidos prototipo son capaces de inducir la curvatura del DNA de la región *bind* [(Koepsel and Khan, 1986), y este trabajo], el acortamiento del DNA por la unión de la proteína a esta región sólo se ha observado en el caso de RepB.

La estrategia que adoptan los plásmidos RC de localizar la secuencia específica de corte en una región rica en pares G + C, sugiere un mecanismo de iniciación de la replicación con requerimientos reguladores más complejos, y adaptado a la necesidad de mantener de manera estable un número preciso de copias del plásmido. En comparación, la replicación RC de fagos como Φ X174 está adaptada al máximo aprovechamiento de los recursos celulares y la producción del mayor número de moléculas antes de la lisis (Novick, 1998). En el caso de Φ X174, la proteína iniciadora no promueve la fusión de la secuencia de corte, localizada en una región rica en pares A + T, cuya apertura estaría dirigida únicamente por la superhelicidad de la molécula. Además, el fago puede ensamblar el replisoma sobre el sustrato cortado específicamente y en forma OC, probablemente por la intervención de la helicasa Rep que desenrollaría el DNA y favorecería la unión de las proteínas replicativas. En contraste, los plásmidos RC necesitan un sustrato abierto, generado después del corte por la reconfiguración de la estructura cruciforme, pero sin la participación de PcrA, que sí interviene en el desenrollamiento del plásmido durante la progresión de la horquilla replicativa.

La información obtenida del análisis de la interacción de RepB con las dos regiones del dso sugiere la existencia de una interrelación entre los sitios primario y secundario de unión de RepB.

La conexión entre ambos loci del *dso* de pMV158 podría estar mediada por interacciones proteína-proteína entre dos hexámeros de RepB, cada uno de ellos unido a un locus diferente, ya que, al menos *in vitro*, no hemos observado que un hexámero de RepB sea capaz de unirse a los loci *nic* y *bind* simultáneamente (véase el apartado 3 del Capítulo 1 de Resultados). Aunque la unión de RepB al locus *bind* en DNA lineal no parece facilitar la unión al locus *nic*, existen indicaciones de cooperatividad positiva en DNA superenrollado. Estas indicaciones proceden de la observación de que la unión al locus *nic* sucede a concentraciones de proteína más bajas cuando el locus de alta afinidad *bind* está presente en la misma molécula de DNA (Figura 22). Las mismas interacciones proteína-proteína que se han propuesto para explicar la formación de los complejos C2 en la unión entre RepB y los fragmentos de DNA *nic* o *bind*, así como el complejo C3 en la unión entre RepB y el fragmento *dso*, podrían estar mediando la cooperatividad positiva aparente en la unión de RepB al locus *nic* en DNA superenrollado que contiene el *dso* entero. De hecho, los experimentos de ultracentrifugación analítica han mostrado que, a concentraciones de RepB mayores de 10 μ M, los hexámeros de proteína pueden interaccionar para generar estados de agregación de mayor orden (véase el apartado 2 del Capítulo 2 de Resultados).

La secuencia de DNA de pMV158 situada entre las PDR y las DDR se caracteriza por presentar una región rica en pares de bases A + T, que está conservada en otros plásmidos de la familia (Figura 51) y que pueden constituir un sitio de unión para proteínas arquitecturales que reconocen el DNA distorsionado. De hecho, algunas timinas de la cadena no-codificante de esta región rica en pares A-T presentan una marcada reactividad al KMnO_4 en DNA superenrollado de pMV158 con independencia de la unión de RepB, lo que es indicativo de una región de DNA realmente distorsionada (Figura 23 A). El doblamiento, mediado por un factor del hospedador, del DNA interpuesto entre las PDR y las DDR podría provocar el acercamiento de los sitios primario y secundario de unión de RepB en el *dso*, facilitando la carga de la proteína sobre el locus *nic*. De hecho, el análisis de la interacción de RepB con DNA superenrollado de pMV158 muestra una fuerte distorsión de la doble hélice del DNA en una región próxima a las DDR (Figuras 23 C y D y 24). Esta alteración sólo se observa cuando RepB está unida a ambos loci del *dso* de pMV158, y se puede considerar como una indicación de la formación de un lazo en DNA superenrollado, como está descrito para AraC (Schleif, 1992), LacI (Swigon *et al.*, 2006) o GalR (Aki and Adhya, 1997; Geanakopoulou *et al.*, 2001).

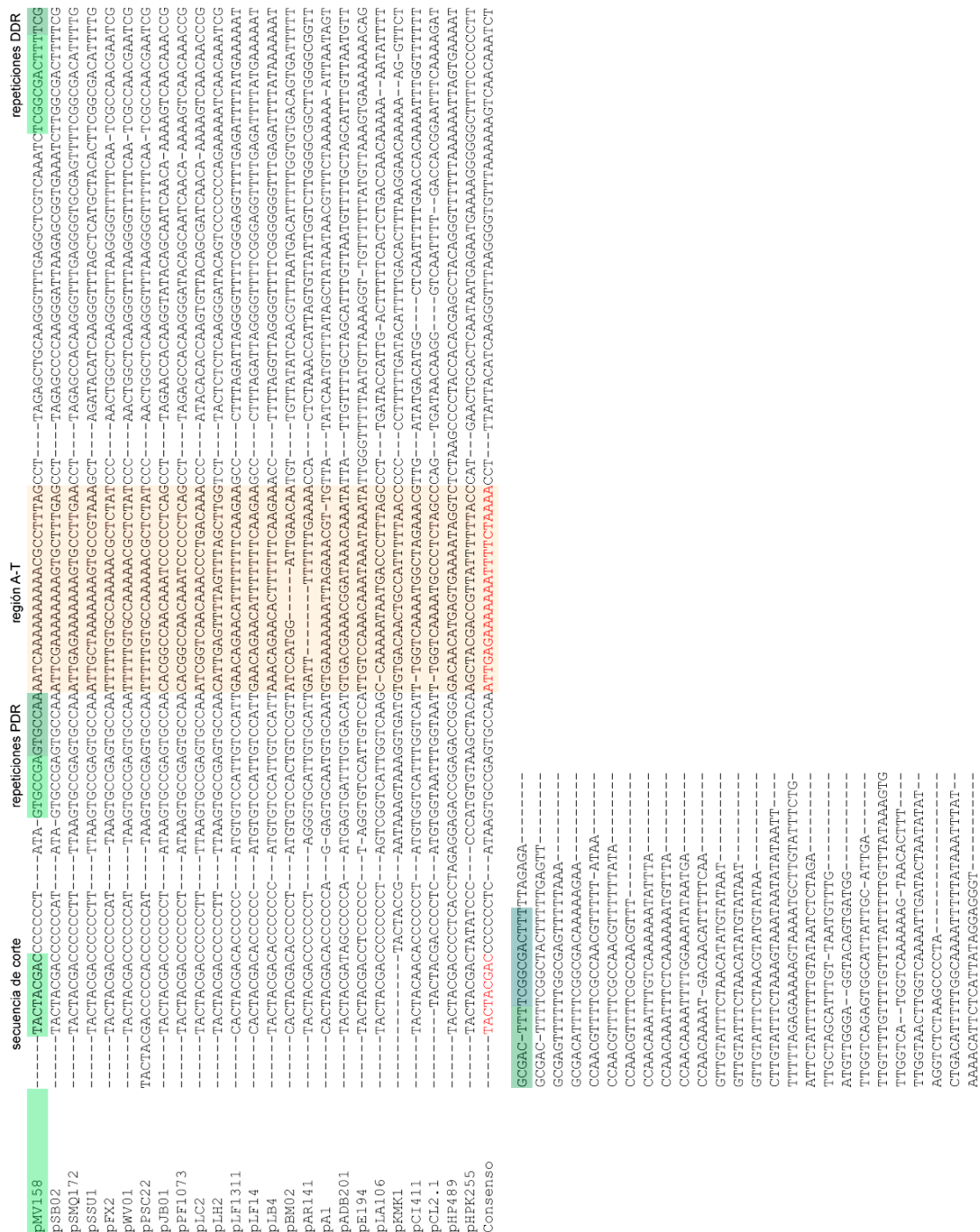


Figura 51. **Alineamiento de la secuencia del *dso* de los plásmidos de la familia de pMV158.** Los distintos elementos del *dso* de pMV158 se indican en color verde en su secuencia. En la última posición del alineamiento se muestra la secuencia consenso proporcionada por el programa ClustalW, en la que se resaltan en rojo la secuencia consenso de corte y la secuencia rica en bases A+T.

La capacidad inherente del DNA para curvarse y enrollarse ha sido objeto de estudio general tanto a nivel teórico como experimental, ya que este tipo de deformación del DNA es muy común en la formación de complejos proteína-DNA. Los estudios clásicos mostraron al DNA bicatenario como un polímero semiflexible con un longitud de persistencia a la curvatura P igual a 50 nm (≈ 150 pb) (Cloutier and Widom,

2005). Esto significa que las moléculas de DNA con una longitud mayor que P se curvarían suavemente de manera casi espontánea y requerirían una fuerza relativamente pequeña para ser curvadas significativamente, mientras que las que tuvieran una longitud más corta que P serían casi rectas y se requeriría mas fuerza para poder curvarlas. Asimismo, los estudios realizados sobre la capacidad de enrollamiento del DNA mostraron que esta molécula se comporta como una vara elástica y enrollable, con un módulo de torsión de $\approx 2,4-4,5 \times 10^{-19}$ erg·cm (Cloutier and Widom, 2005), por lo que se requieren cantidades considerables de fuerza para enrollar significativamente un DNA de una longitud menor que la correspondiente longitud de persistencia a la torsión ($\approx 170-320$ pb). Esta descripción del DNA indica que la curvatura fuerte del DNA, y cualquier tipo de enrollamiento, es llevada a cabo *in vivo* por proteínas específicas que, mediante la aplicación de una fuerza, son capaces de contrarrestar la rigidez inherente del DNA. Por tanto, la curvatura del DNA de 84 pb que separa las DDR del sitio específico de corte en el locus *nic* requeriría la actuación de proteínas específicas que moldearían el DNA. A pesar de que estas teorías sobre las propiedades físicas del DNA se habían utilizado para describir situaciones de fuerte curvatura, como la que sucede en los nucleosomas, el comportamiento del DNA en regímenes de curvatura pronunciada no se había estudiado experimentalmente. En un estudio reciente (Cloutier and Widom, 2005), los autores utilizan el método de circularización por la ligasa para analizar y cuantificar la capacidad de pequeños fragmentos de DNA bicatenario (89 a 116 pb) con extremos cohesivos para curvarse espontáneamente y formar círculos cerrados por la acción de la ligasa. Los resultados de estos experimentos revelan que la capacidad inherente del DNA para curvarse es mucho mayor de lo que estaba predicho anteriormente. Esta capacidad se conserva incluso cuando la periodicidad helicoidal no es óptima y es necesario que el DNA varíe su grado de enrollamiento para que los extremos cohesivos se puedan ligar, lo que implica que un DNA fuertemente curvado también es muy flexible para el enrollamiento. Una de las consecuencias biológicas que, según los autores, tendrían estos resultados afecta al papel que desempeñarían algunas proteínas arquitecturales, como HU, en la formación de lazos en los complejos reguladores de la expresión génica. El hecho de que dos dímeros de GalR, unidos al DNA en sus sitios específicos, se puedan unir para formar un represosoma tetramérico incluso en ausencia de HU (Semsey *et al.*, 2004), se debería a que la energía libre de la interacción proteína-proteína sería suficiente para superar el coste energético real de la formación de un lazo de DNA, que es mucho menor de lo que predecían las teorías clásicas. Por tanto, las proteínas tipo-HU, más que determinar la formación del lazo (en primera instancia), actuarían estabilizando aquellos lazos formados espontáneamente por la interacción de proteínas unidas de manera específica al DNA. En nuestro caso, las conclusiones obtenidas de este trabajo parecen conferir un nuevo protagonismo al DNA espaciador de 84 pb que separa los loci *nic* y *bind*, de manera que tanto la secuencia de la región rica en bases A + T como las proteínas arquitecturales participarían en la estabilización de un posible lazo, generado gracias a la flexibilidad inherente del DNA, que aproximaría los sitios primario y secundario de unión de RepB en el *dso*.

La secuencia del dso de los plásmidos de la familia de pMV158.

En los últimos años, el número de plásmidos RC de la familia de pMV158 descritos en la literatura ha aumentado hasta alcanzar el número de 24 replicones. Por esta razón, y gracias a la disponibilidad de su secuencia, hemos realizado el alineamiento de la región *dso* de todos ellos para determinar si presentan una organización similar a la que encontramos en pMV158. La Figura 52 muestra que todos los replicones tienen una organización similar: una secuencia de corte conservada y, en dirección 3', dos grupos de repeticiones directas: las próximas al sitio de corte o PDR, y las distales o DDR. Las excepciones fueron los plásmidos de *Helicobacter pylori* (pHPK255 y pHP489), y los plásmidos pCI411, pLA106 y pCL2.1, procedentes de bacterias lácticas, para los cuales no hemos encontrado las repeticiones DDR. Las PDR, descritas por primera vez en este trabajo, consisten en dos o tres repeticiones de 7 u 8 pb localizadas a una distancia corta (10-18 pb) a 3' del sitio de corte, y presentan homología entre los plásmidos de la familia. Por el contrario, las repeticiones DDR sólo están conservadas entre los plásmidos más relacionados, que forman subfamilias dentro de la familia de pMV158. En la mayoría de los plásmidos, las DDR consisten en dos o tres repeticiones perfectas o imperfectas de 11 pb dispuestas en tándem, aunque en algunos de los plásmidos que contienen tres repeticiones, la más distal presenta una delección o inserción de 1 pb (Figura 52). En algunos plásmidos, las DDR están constituidas por repeticiones de una longitud distinta de 11 pb, a pesar de lo cual abarcan aproximadamente una o dos vueltas de la doble hélice del DNA: hay dos repeticiones directas de 10 pb en el plásmido pKMK1 de *Mycoplasma mycoides*, dos repeticiones de 12 pb en el plásmido pA1 de *Lactobacillus plantarum*, y tres repeticiones de 21 pb en el plásmido pADB201 de *M. mycoides*. En el plásmido pE194 de estafilococo encontramos unas DDR con una fase de 20 pb que consisten en dos repeticiones de 8 pb separadas por un espaciador de 12 pb (Figura 52). De la misma manera, en el plásmido de *Lactococcus lactis* pBM02 encontramos dos repeticiones imperfectas de 8 pb separadas por un espaciador de 12 pb. Estas observaciones nos permiten afirmar que las repeticiones directas que constituyen las DDR de los miembros de la familia de pMV158, cuando se encuentran presentes, están aproximadamente en fase con la repetición helicoidal del DNA. Ya que consideramos a las DDR como el sitio primario de unión de las proteínas Rep de cada uno de estos replicones, su disposición relativa en fase sugiere la interacción de un iniciador oligomérico con las repeticiones del locus *bind* por la misma cara de la doble hélice de DNA. Por otra parte, la disposición de las secuencias PDR y DDR en los plásmidos pPSC22, pFX2 y pWV01, pertenecientes a la misma subfamilia, también merece atención. En estos plásmidos, que contienen idénticas PDR y DDR, la distancia entre el sitio de corte y ya sean las PDR o las DDR varía, pero el espaciado entre ambos grupos de repeticiones directas se mantiene (Figura 52). Aunque faltan datos experimentales que permitan obtener una conclusión válida, el mantenimiento de la fase entre las PDR y las DDR podría ser un requerimiento para la replicación *in vivo* de estos plásmidos. De hecho, antes de la realización de esta tesis se había mostrado que una construcción derivada de pMV158 en la que se alteró el espaciado

por inclusión de 5 pb entre las PDR y las DDR, fue incapaz de replicar *in vivo* (M. Moscoso, G. del Solar, M. Espinosa, sin publicar). Tras analizar en detalle la secuencia del *dso* de pMV158 observamos que, curiosamente, las secuencias de la unidad de repetición de las DDR y las PDR (esta última más corta) conservan bastantes similitudes. Al comparar la secuencia 5'-GT—GCCGA-3' en la cadena codificante de las PDR, con la secuencia 5'-AAAGTCGCCGA-3' en la cadena no codificante de las DDR, se observan siete bases idénticas (en negrita). Sin embargo, no se observó un patrón repetido de protecciones frente a HO• y DMS en las PDR, lo que indica que RepB, al menos en su estado hexamérico, no interacciona de la misma manera con las dos repeticiones directas que forman parte de la región *nic* del *dso*.

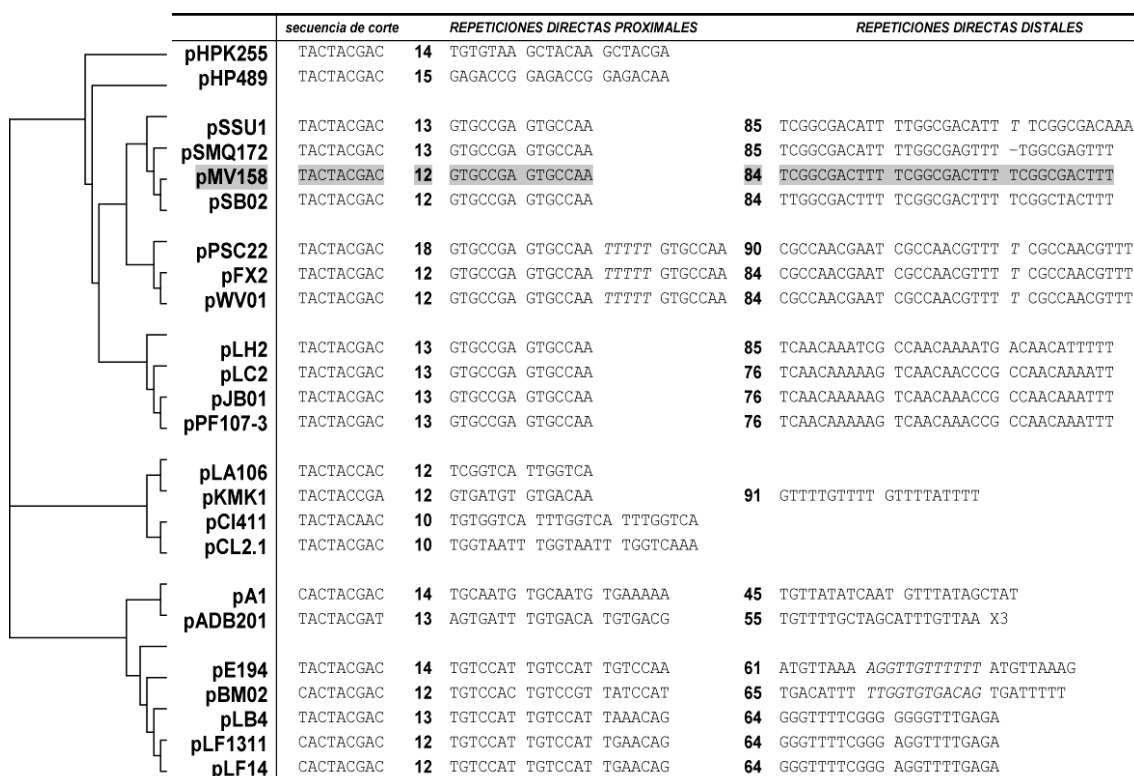


Figura 52. Conservación del *dso* en los plásmidos de la familia de pMV158. Los miembros de la familia están agrupados en función de la identidad de secuencia, de manera que la distancia entre ellos se representa mediante un árbol filogenético. Se observa homología en el locus *nic*, con la secuencia de corte conservada en todos los plásmidos. Las divergencias aparecen en las DDR, que no parecen existir en todos los casos. Las DDR propuestas sólo se han demostrado como sitio de unión específico para la correspondiente proteína Rep en el caso de pMV158 (Moscoso *et al.*, 1995b) y en el plásmido de *Enterococcus faecium* pJB01 (Kim *et al.*, 2006).

¿Es el hexámero de RepB la forma activa en replicación?

El estado de asociación hexamérico de RepB tras su purificación a partir del sistema de expresión en *E. coli* es único entre las proteínas Rep de plásmidos RC caracterizadas hasta el momento. La mayoría de estas proteínas se purifican como monómeros, como las proteínas Rep de la familia de pC194 (Noirot-Gros *et al.*, 1994), o dímeros, como las de la familia de pT181 (Novick, 1989; Rasooly *et al.*, 1994;

Thomas *et al.*, 1990; Zhao *et al.*, 1998). Sin embargo, se ha observado que algunas de estas proteínas tienden a formar multímeros al unirse a DNA, lo que sugiere que la formación de oligómeros es necesaria para algunas de las actividades bioquímicas de los iniciadores (Müller *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 1998).

La presencia de hexámeros de RepB en células de neumococo con pMV158 confiere a esta forma oligomérica un significado biológico, por lo que es probable que la capacidad de RepB para hexamerizar tenga un papel relevante en su función. Sin embargo, no está claro si son los hexámeros preformados, o los dímeros (que parecen coexistir *in vivo* con los hexámeros), la forma activa que se une al origen e inicia la replicación plasmídica. De hecho, la proteína RepB purificada como hexámero, aunque es activa en la unión específica al locus *bind* y en el corte y corte/cierre específico de secuencia en el locus *nic*, no es capaz de formar un complejo covalente estable con el extremo 5'-P generado por el corte del DNA. Los ensayos realizados para estudiar la reacción de transferencia de cadena en el origen de replicación sugirieron la formación de un complejo covalente transitorio entre RepB y el DNA cortado (Moscoso *et al.*, 1997), algo que fue demostrado para la proteína gpII de los colifagos filamentosos (Asano *et al.*, 1999). Las reacciones de transferencia de cadena mediadas por RepB, como aquellas que generan el intermedio replicativo monocatenario constituido por la cadena parental desplazada, requieren que el extremo 5'-P que se va a ligar, procedente de la reacción de corte inicial en el caso de la replicación plasmídica, esté unido a la proteína (Moscoso *et al.*, 1995a). Por tanto, es muy probable que *in vivo* tengan lugar reacciones de transferencia de cadena isoenergéticas, donde la energía procedente de la rotura del enlace fosfodiéster se conserva como enlace tirosil-fosfodiéster para el siguiente corte en la etapa de terminación. Sin embargo, un enlace tirosil-fosfodiéster que se disocie rápidamente, ya sea por hidrólisis o mediante la catálisis del cierre del DNA, sería apropiado en la reacción de corte durante la terminación de la cadena líder, ya que impediría la reiniciación incontrolada de la replicación plasmídica. Por tanto, y teniendo en cuenta estos argumentos, no podemos descartar que la iniciación de la replicación de pMV158 esté mediada por una conformación de RepB (diferente del hexámero en el que se purifica) que permita la formación de un enlace covalente estable con el DNA cortado.

Así, la finalidad de la hexamerización de RepB no está clara. RepB, al igual que otros iniciadores RCR de plásmidos y bacteriófagos, no presenta ni actividad ATPasa ni helicasa. La actividad helicasa de dsDNA es necesaria, tanto en replicación por RC como en conjugación plasmídica, para desplazar la cadena líder después del corte inicial. En el caso de la replicación RC de fagos y plásmidos, la actividad helicasa está proporcionada por el huésped. Por ejemplo, las helicasas Rep y UvrD de *E. coli* están implicadas en la replicación de bacteriófagos de cadena sencilla (como Φ X174) y de plásmidos RC, respectivamente (Bruand and Ehrlich, 2000; Takahashi *et al.*, 1978). En bacterias Gram-positivas se ha observado que la helicasa PcrA interacciona con los iniciadores plasmídicos RCR [(Chang *et al.*, 2002) y este trabajo], y que esta interacción recluta la helicasa en el origen plasmídico e incrementa su procesividad de desenrollamiento (Soultanas *et al.*, 1999). En la transferencia conjugativa, los

plásmidos F y R388 codifican “relaxasas” específicas que además presentan actividad helicasa en su dominio C-terminal (Llosa *et al.*, 1996; Sikora *et al.*, 2006). Algunos dominios RCR de proteínas Rep de virus animales y vegetales presentan la capacidad de oligomerizar por ellos mismos o al unirse específicamente al DNA. En el modelo de replicación del virus AAV-5, la unión de seis monómeros de proteína Rep a su sitio específico de unión, constituido por cinco repeticiones directas, conduce al ensamblaje de los dominios helicasa C-terminales para formar un anillo hexamérico en el sitio de corte (Hickman *et al.*, 2004). Otro ejemplo es la proteína Rep del geminivirus TYLCV, que aunque tiende a formar agregados que precipitan, los derivados que pierden el dominio endonucleasa N-terminal son solubles y forman hexámeros o dodecámeros (Clérot and Bernardi, 2006). La oligomerización de las proteínas Rep RCR de estos virus animales y vegetales es esencial para la replicación viral, y está destinada a la formación de anillos hexaméricos, típicos de la familia de proteínas AAA+ [ATPasas asociadas con procesos celulares (Neuwald *et al.*, 1999)], que pertenecen a la superfamilia SF3 de helicasas virales, que actúan como hexámeros o dodecámeros (Enemark and Joshua-Tor, 2006).

La distribución de los dominios de la porción N-terminal de la proteína Rep del virus TYLCV es parecida a la que presenta la proteína RepB entera. En ambos casos, unos 120 aminoácidos del dominio N-terminal, que contienen las actividades de unión al origen, de corte y de transferencia de cadena, preceden al dominio de oligomerización, que supone 74 aminoácidos en RepB (el dominio C-terminal implicado en la hexamerización) y 61-89 aminoácidos (dependiendo de los autores) en Rep de TYLCV (Campos-Olivas *et al.*, 2002; Clérot and Bernardi, 2006). En la proteína iniciadora viral, el dominio de oligomerización, que está seguido del dominio que contiene las actividades ATPasa y helicasa, es necesario para la unión específica de la proteína al origen de replicación viral (Orozco *et al.*, 1997). Algo parecido ocurre con la proteína Rep del plásmido pJB01, que pertenece a la familia de pMV158, en la que la eliminación del dominio C-terminal suprime la unión al locus *bind* (Kim *et al.*, 2006). Aunque todavía no se conoce la estructura atómica del dominio de oligomerización de la proteína Rep de TYLCV, las predicciones sobre su composición en estructura secundaria indican que estaría compuesta principalmente por hélices α (no se muestra), al igual que el dominio C-terminal de RepB (cuya secuencia primaria no está relacionada con el dominio viral). Además, el dominio de oligomerización no está conservado entre las helicasas de la superfamilia SF3 (Clérot and Bernardi, 2006), lo mismo que sucede con los dominios C-terminales de las proteínas Rep de la familia de pMV158, que están menos conservados que los correspondientes dominios N-terminales [(del Solar *et al.*, 1993a); Figura 6]. En las proteínas Rep de bacteriófagos y de plásmidos RC de familias diferentes de la de pMV158, no se encuentra este tipo de dominios de oligomerización. En este sentido, el iniciador RepB de pMV158 podría constituir un nexo evolutivo entre las proteínas Rep de bacteriófagos y plásmidos RC y aquellas de virus.

La estructura tridimensional de RepB sugiere que el hexámero de proteína tendría la conformación que reconoce eficientemente el dsDNA del sitio de unión específico en el locus *bind*. No obstante, no podemos descartar la posibilidad de que,

en condiciones fisiológicas, RepB exista en un estado de asociación diferente del hexámero en el interior de las células de neumococo. Podría ocurrir que las subunidades de proteína iniciadora se unieran cooperativamente a la secuencia DDR para generar un complejo nucleoproteico similar al que resulta de la unión del hexámero preformado al locus *bind*.

¿Cuál es la región de RepB que interacciona con el DNA del locus bind?

El análisis comparativo por ME del hexámero de RepB libre y unido al locus *bind* indica que la interacción específica con el dsDNA se realiza a través del dominio N-terminal de la proteína, también implicado en las actividades endonucleolítica y de transferencia de cadena. Este resultado es compatible con el potencial electrostático de la superficie de RepB, que es electropositivo en el dominio N-terminal y en toda la superficie de la parte interna del hexámero, lo que favorecería la interacción electrostática no específica con el DNA, que presenta carga neta negativa.

A falta de otros datos estructurales sobre la interacción de RepB con el DNA del *dso*, la localización de la superficie de contacto con el dsDNA específico en el dominio N-terminal coincide con los resultados obtenidos en otras proteínas Rep. Por ejemplo, en la proteína Rep del plásmido pJB01 se han realizado estudios de delección que demuestran que la parte N-terminal de la proteína desempeña un papel crucial en la actividad de tipo topoisomerasa I y de unión específica a DNA (Kim *et al.*, 2006). De manera similar, el dominio N-terminal de la proteína AL1, que es un iniciador de la replicación RC de geminivirus, es necesario para las actividades de unión específica y de corte del DNA (Orozco *et al.*, 1997). Además, las estructuras resueltas de los dominios N-terminales de las proteínas Rep de AAV-5 y E1 de papilomavirus, en complejo con sus DNAs específicos, han mostrado que el reconocimiento del dsDNA está realizado por elementos estructurales que acompañan a la lámina β central (Enemark *et al.*, 2000; Hickman *et al.*, 2004).

Aunque el potencial electrostático de la superficie del dominio N-terminal de RepB pueda facilitar interacción no específica con el DNA, los resultados del análisis de alta resolución de los contactos entre RepB y el locus *bind* (Capítulo 1 de Resultados) sugieren que en la proteína hexamérica existen tres motivos idénticos de unión específica a dsDNA que se unirían a las tres repeticiones directas del locus *bind*. Al analizar la disposición de los diferentes elementos de estructura secundaria de cada protómero de RepB en la estructura del hexámero, observamos que la hélice α_2 podría contener un motivo de unión específica a dsDNA. Esta hélice está localizada en la superficie de la cara interna del dominio N-terminal de cada monómero (Figura 53), y su disposición sería compatible con la interacción de las tres subunidades que forman un trímero (en la estructura del cristal trigonal) con las tres repeticiones directas del locus *bind*. La hélice α_2 se caracteriza por estar compuesta por varios residuos básicos (tres lisinas y una arginina) que suelen intervenir en la interacción con el DNA. Además, y según el alineamiento de secuencia de varias proteínas Rep de la familia de pMV158 (Figura 6), se puede constatar que la hélice α_2 corresponde a una región divergente entre las diferentes proteínas analizadas, aunque este grado de

divergencia es menor (no se muestra) cuando se comparan las proteínas Rep de los plásmidos más relacionados con pMV158, lo cual es consistente con la homología de secuencia del locus *bind* en esos plásmidos (Figura 52).

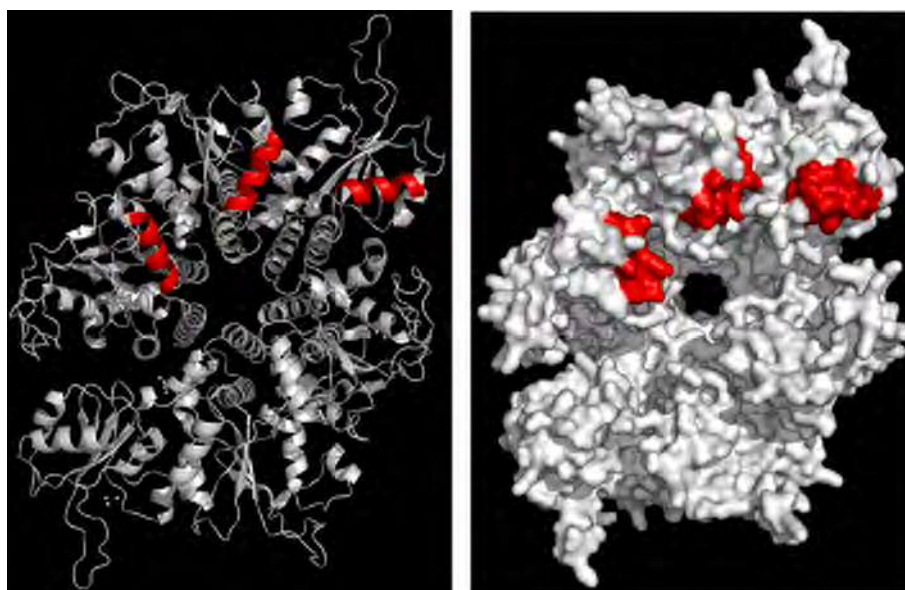


Figura 53. **Posibles motivos de unión al DNA del locus *bind* en el hexámero de RepB.** En la figura se indica en rojo la hélice α_2 de cada uno de los protómeros que forman uno de los dos trímeros en la región N-terminal del hexámero de RepB. En la parte izquierda de la figura se muestra una representación en forma de cintas, y en la parte derecha se muestra una representación de la superficie molecular del hexámero.

¿Por qué los plásmidos de la familia de pMV158 han evolucionado generando un sitio de unión de alta afinidad apartado del sitio de corte?

Como ya se ha comentado a lo largo de esta tesis, uno de los elementos comunes en la iniciación de la replicación los plásmidos de las familias de pT181 y pMV158 consiste en la extrusión del cruciforme de la región *nic*. Este hecho satisfaría dos requerimientos diferentes en la iniciación: la generación de un sustrato monocatenario para la reacción de corte específica de secuencia, y el establecimiento de una región abierta en el DNA del *dso* necesaria para el ensamblaje de la maquinaria replicativa. Sin embargo, aunque el reconocimiento del *dso* de pMV158 por parte del iniciador RepB presenta características comunes con otros plásmidos RC, el estado de oligomerización de RepB en forma de hexámero, y la presencia de repeticiones directas en el locus *bind*, son características propias de los plásmidos de la familia de pMV158 que sugieren un mecanismo de iniciación de la replicación diferente.

Aunque el hexámero de RepB no fuera la configuración activa en la iniciación de la replicación, las repeticiones directas del locus *bind* podrían dirigir la oligomerización de RepB, de manera que la interacción con el *dso* se convertiría en un proceso secuencial y dinámico. Así ocurre en la iniciación de la replicación de algunos virus de DNA como el papilomavirus, el AAV o el SV40, cuyas proteínas iniciadoras

E1, Rep y antígeno-T grande, respectivamente, son helicasas de la superfamilia SF3 que forman anillos hexaméricos, con mayor relación estructural con las proteínas de la familia AAA+ que con RecA (Enemark and Joshua-Tor, 2006; James *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2003), lo cual es consistente con su participación en la iniciación de la replicación. La unión específica al origen de replicación conduce al ensamblaje del anillo hexamérico que rodearía al DNA bicatenario de esta región. En los tres casos, las proteínas sufren una transición desde la unión a dsDNA específica de secuencia (actividad de unión al origen) hasta la unión y desenrollamiento inespecífico de ssDNA (actividad helicasa), gracias al cambio estequiométrico de monómero (Rep) o dímero (E1 y antígeno-T grande) hasta hexámero (que es doble en el caso de E1 y antígeno-T grande) (Enemark and Joshua-Tor, 2006; Hickman *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2003). En el proceso de transición aparecen una serie de estados oligoméricos intermedios, que se ensamblan directamente sobre el DNA del origen, y que distorsionan progresivamente el DNA hasta conseguir la apertura de las dos hebras (Chen and Stenlund, 2002; Schuck and Stenlund, 2005). Una vez se ha ensamblado el replisoma, las helicasas de esta superfamilia actúan como helicasas replicativas.

El proceso de inicio de la replicación de pMV158 presenta elementos comunes con la replicación de AAV-5. En ambos casos las proteínas de replicación de unen a repeticiones directas alejadas del sitio de corte, aunque en el origen viral la secuencia RBS sólo está separada por 21 bases del sitio de corte. En AAV-5, la oligomerización de la proteína Rep sucede en un proceso dinámico que, en último término, establece una forma activa del origen de replicación, ya que, gracias a la actividad helicasa del hexámero recién ensamblado, el sitio de corte queda en configuración monocatenaria y, por tanto, expuesto a la actividad endonucleasa de uno de los protómeros de Rep. En la replicación de pMV158, la secuencia comenzaría con la unión de RepB a su sitio de alta afinidad, lo que a su vez favorecería su posicionamiento en la región *nic*. En el siguiente paso, y como consecuencia del evento anterior, tendría lugar la extrusión de la cruciforme IR-I y, finalmente, la proteína cortaría en el sitio de inicio de la replicación. Si la unión de RepB a los dos loci del *dso* ocurriera de una forma secuencial, como en el caso de las proteínas virales, se podría alcanzar una conformación de la proteína (diferente de la del hexámero preformado que se purifica a partir de *E. coli*) activa para la iniciación de la replicación, que quedara covalentemente unida al extremo 5' generado en el corte. La separación entre el locus *bind* y el sitio de corte podría constituir también un factor determinante en la extensión de la región desapareada que se generaría tras el corte efectuado por RepB en la iniciación. En este sentido, la promiscuidad de pMV158 podría estar relacionada con la adquisición de una estrategia en la que la nueva configuración del DNA del origen tras el corte inicial permitiría el ensamblaje de la maquinaria replicativa del hospedador en condiciones poco restrictivas. Además, la presencia de la proteína iniciadora serviría para reclutar a las proteínas que se ensamblarían para formar el replisoma. Por tanto, las interacciones específicas proteína-proteína y proteína-DNA, que se establecen en los sucesivos complejos nucleoproteicos, serían esenciales para la replicación.

La expresión del operón pcrA-radC es esencial para S. pneumoniae

PcrA es una helicasa de bacterias Gram-positivas que pertenece a la superfamilia SF1 de helicasas de ácidos nucleicos. PcrA comparte un 40 % de identidad con las helicasas Rep y UvrD de *E. coli*, y alrededor de un 30 % y un 20 % de identidad con las helicasas Srs2 y Hmi1p de *S. cerevisiae*, respectivamente. Se ha descrito que PcrA desempeña funciones esenciales en bacterias Gram-positivas, un hecho corroborado por la capacidad de PcrA para recuperar la viabilidad de un doble mutante de *E. coli* sin los genes *rep* y *uvrD* (Petit *et al.*, 1998). Sin embargo, los resultados obtenidos en las pruebas de esencialidad de PcrA *Spn*, realizadas con una estrategia similar a la utilizada en otras bacteria (Thanassi *et al.*, 2002), no permiten determinar sin ambigüedad la esencialidad de PcrA para el crecimiento de neumococo. No obstante, al analizar la expresión del gen *pcrA* de *S. pneumoniae* en su contexto genómico, observamos que, junto con *radC*, forma parte de una unidad transcripcional cuya expresión sí es esencial para la bacteria, al menos en nuestras condiciones de cultivo. Sin descartar otras posibilidades, el gen que parece conferir el carácter esencial al operón es el propio *radC*. De hecho, un estudio reciente dirigido a la identificación de genes esenciales en la estirpe R61 de *S. pneumoniae*, mediante una estrategia de mutagénesis por reemplazamiento alélico, incluye a *radC* dentro de la lista de 133 nuevos genes esenciales del total de 693 analizados (Song and Kwan Soo Ko, 2005). Esta estrategia minimiza el efecto polar de la interrupción del gen cuya esencialidad se estudia. El casete de resistencia a kanamicina, que se introduce en el interior de gen, carece de terminadores transcripcionales y está orientado en la misma dirección que el gen interrumpido, asegurando así la transcripción de la región 3' del gen (Song and Kwan Soo Ko, 2005). En comparación, nuestra estrategia de reemplazamiento génico, que maximiza el efecto polar de la interrupción de *pcrA* al incluir el gen *cat* su propio terminador transcripcional, nos ha permitido determinar no sólo la esencialidad de *radC*, sino también la importancia de la transcripción dirigida por el promotor Pa para la expresión del operón *pcrA-radC*. Quizá sea éste uno de los aspectos más relevantes de los resultados expuestos en este apartado, ya que es la primera vez que se estudia la expresión de *pcrA* en su contexto genómico.

Durante la realización de este trabajo de tesis se realizaron algunos intentos de interrumpir la expresión de *pcrA* a nivel traduccional mediante la utilización de un RNA antisentido dirigido contra la región 5' del gen (incluido el sitio putativo de unión a ribosomas). Para este fin, utilizamos el plásmido pLS1R (Puyet *et al.*, 1993), un vector construido para *S. pneumoniae*, basado en el replicón pLS1. Este vector, que incluye el gen *malR*, fue desarrollado para regular la expresión de genes que están bajo el control del promotor inducible P_M, que pertenece al operón *malMP*, y que a su vez está regulado por MalR, producto del gen *malR*. Para adaptar este vector a nuestras necesidades, decidimos incluir la región operadora P_X-P_M en el vector pLS1R (lo cual generó el vector pLS1RO_{XM}). A continuación, clonamos bajo el control del promotor P_M los fragmentos del gen *pcrASpn* que generarían el RNA "antisentido" o el RNA "sentido", este último utilizado como control negativo (Figura 54 A). El RNA "antisentido" generado a partir de la expresión del fragmento del gen *pcrASpn* clonado

en el vector pLS1RO_{MX}, tiene un tamaño de unas 400 bases y es complementario a la región 5' del mRNA de *pcrA*, razón por la cual pensamos que podría interferir con la unión de los ribosomas y, por tanto, con la síntesis de la proteína.

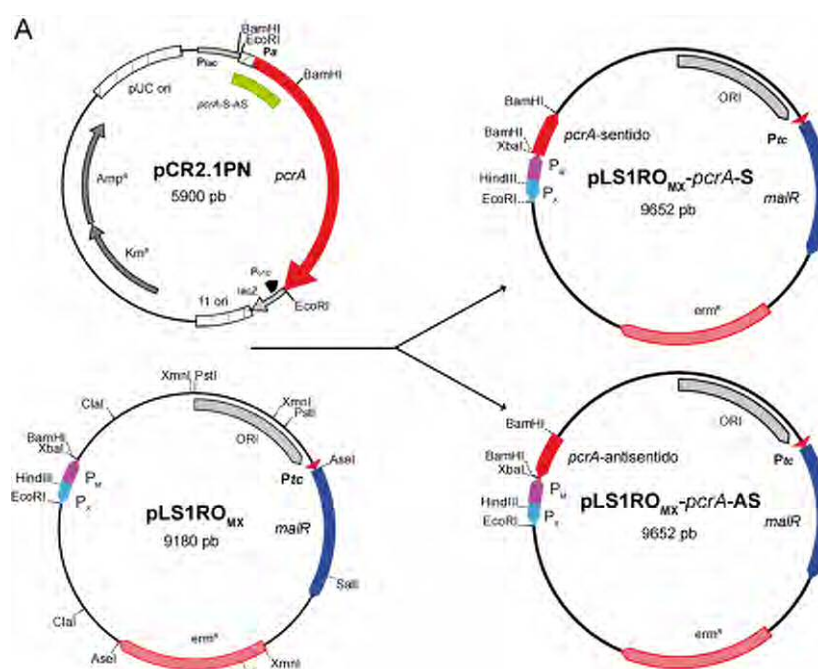
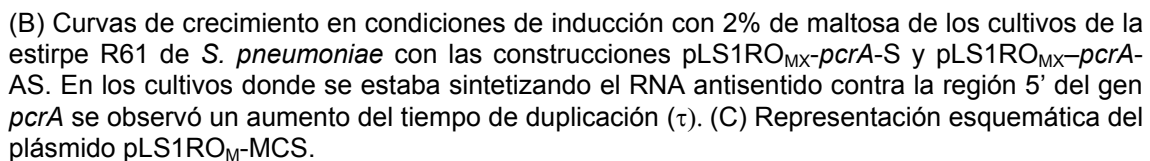


Figura 54. **Experimentos de interrupción de la traducción de *pcrA* mediante RNA antisentido.** (A) Construcción de los plásmidos basados en pLS1RO_{MX} para la expresión regulada de los RNA "sentido" y "antisentido". El fragmento de unas 400 pb procedente de la digestión con BamHI de pCR2.1PN (*pcrA*-S-AS) se insertó en el sitio complementario BamHI del plásmido pLS1RO_{MX}. De esta manera se generaron dos construcciones en las que el mismo fragmento *pcrA*-S-AS estaba clonado en las dos orientaciones posibles respecto al promotor P_M. La construcción pLS1RO_{MX}-*pcrA*-AS se utilizó para inducir la expresión controlada del RNA "antisentido" complementario a la región 5' del mRNA de *pcrA*, mientras que la construcción pLS1RO_{MX}-*pcrA*-S se utilizó como control negativo.

Los experimentos de inducción de la expresión del RNA "antisentido" se realizaron en la estirpe R61 de *S. pneumoniae* transformada con el plásmido pLS1RO_{MX}-*pcrA*-AS, para la expresión del RNA antisentido. El plásmido pLS1RO_{MX}-*pcrA*-S se utilizó para la expresión del RNA sentido en el experimento control. Los cultivos se indujeron a una OD₆₅₀ de 0,1 con maltosa al 2%. Para aumentar el rendimiento de la inducción, retiramos la sacarosa presente en el medio mediante varios lavados con medio de cultivo antes de añadir la maltosa. Al comparar las curvas de crecimiento (Figura 54 B) observamos que los cultivos donde se indujo la expresión del RNA antisentido contra el mRNA de *pcrA* presentaban un ligero aumento en su tiempo de duplicación en comparación con el cultivo donde se expresó el RNA sentido control. Este resultado es compatible con el obtenido en los experimentos de interrupción de *pcrA* por reemplazamiento génico, y aporta más argumentos en contra de la esencialidad de *pcrA* en neumococo. En este punto es conveniente señalar que con la realización de estos ensayos también pretendíamos construir un vector para la expresión controlada de RNA "antisentido" que fuera útil para evaluar la función de determinados genes en *S. pneumoniae*. La versión final de este vector es el plásmido



Además de analizar la expresión de *pcrA* en *S. pneumoniae*, hemos realizado una primera caracterización bioquímica de PcrASpn centrándonos en su capacidad de actuar sobre diferentes sustratos de DNA. La helicasa PcrA de neumococo presenta especificidad de unión por sustratos que poseen estructuras secundarias. Aunque su capacidad para unirse a los sustratos C y D (Figura 48) es similar, la helicasa muestra una ligera preferencia por unirse al sustrato D, es decir, aquel que contiene un extensión de DNA de cadena sencilla formando una estructura tipo tallo-lazo en el extremo 3'. Por tanto, el reconocimiento de este tipo de estructuras secundarias, que se asemejan a las que existen en el *dso* de pT181, es igualmente específico ya se generen en la región 3' o 5' de los sustratos utilizados. Otra conclusión que podemos obtener tanto de los ensayos de unión a DNA como de los ensayos de actividad, es que la actividad helicasa de PcrASpn es óptima con los sustratos a los que se une más eficazmente. La actividad helicasa específica de estructura es característica de otras helicasas de la superfamilia SF1. Recientemente se ha estudiado la actividad de Hmi1p, una helicasa mitocondrial de *S. cerevisiae* esencial para el mantenimiento funcional del DNA mitocondrial (Kuusk *et al.*, 2005). Hmi1p es capaz de desenrollar sustratos con extensiones monocatenarias en el extremo 3'. La longitud de la

extensión 3' necesaria para el reconocimiento eficaz del sustrato se reduce notablemente (de 19 a 9 nt) cuando forma parte de una estructura ramificada, con la extensión 5' también de la misma longitud (Kuusk *et al.*, 2005). Cuando el sustrato mimetiza las estructuras que aparecen en el proceso de desplazamiento de cadena durante la recombinación, la longitud de la extensión 3' desapareada necesaria para que Hmi1p desenrolle el sustrato se reduce a 5 nt (Kuusk *et al.*, 2005). Otras helicasas de la superfamilia SF2, como PriA, WNR, BLM y Sgs1, también presentan actividad helicasa y de unión a DNA específica de estructura (Bennett *et al.*, 1999; Mohaghegh *et al.*, 2001; Polard *et al.*, 2002). Tanto la naturaleza del sustrato como las características de su actividad helicasa estarían relacionadas con la función de la proteína *in vivo*. Por ejemplo, Hmi1p facilitaría la progresión de la replicación del DNA mitocondrial a través de regiones que forman estructuras secundarias. Pero además, Hmi1p podría intervenir en la recombinación, ya que reconoce específicamente el tipo de estructuras que aparecen en este proceso. Por otro lado, la esencialidad de PcrA para la viabilidad celular de *S. aureus* y *B. subtilis* podría estar relacionada con su capacidad de reconocer y desenrollar determinadas estructuras. Su actividad sería necesaria en aquellos procesos en los que se formen estructuras tipo tallo-lazo u otras similares, como en la progresión del replisoma a través del DNA cromosómico, o en la maduración de los fragmentos de Okazaki durante la síntesis de la cadena retrasada. Otro de los procesos en los que PcrA podría intervenir consiste en la resolución de estructuras tóxicas procedentes de eventos recombinatorios y/o la reactivación de horquillas de replicación detenidas (Petit and Ehrlich, 2002). Esta actividad de PcrA podría incluso promover la reiniciación de la replicación en los sitios donde el DNA está dañado como consecuencia de lesiones químicas o físicas (Cox *et al.*, 2000; Kowalczykowski, 2000; Morimatsu and Kowalczykowski, 2003). Otras helicasas de la superfamilia SF2 como PriA y RecQ, y el complejo RecBCD (SF1), también estarían implicadas en estas funciones.

Pero la función de PcrA que más nos interesa es su participación en la replicación de pT181 y otros plásmidos RC (Chang *et al.*, 2002; Khan, 2000). PcrA interacciona con el iniciador RepC e inicia el desenrollamiento desde el corte generado por RepC en el origen de pT181 (Chang *et al.*, 2002; Iordanescu, 1993a). El corte del DNA mediado por RepC en la secuencia específica de corte, localizada en la región desapareada de una estructura tipo tallo-lazo, puede generar una región de ssDNA en el extremo 5'. La actividad helicasa de PcrA en la dirección 5'→3' sería la encargada de desenrollar el DNA y de promover la síntesis de la cadena líder del DNA. El resultado de los ensayos de unión a DNA y actividad helicasa con diferentes sustratos (Anand and Khan, 2004) es compatible con la función que la helicasa PcrA de estafilococo desempeñaría en la progresión de la horquilla replicativa durante la replicación plásmidica RC. Sin embargo, y a pesar de que la actividad helicasa de PcrA de neumococo es similar a la de PcrA_{Sau}, su capacidad para iniciar la replicación *in vitro* del plásmido pT181 refleja una significativa falta de procesividad. A este respecto, es conveniente señalar que no hemos sido capaces de establecer el plásmido de estafilococo pT181 en *S. pneumoniae*, a pesar de que el gen *tet* que lleva este plásmido tiene una elevada homología con el gen *tet* del plásmido pMV158 (Lacks *et*

al., 1986). PcrASpn presenta un 50% de identidad de secuencia con las helicasas PcrA de *S. aureus*, *B. cereus* y *B. anthracis*, todas ellas capaces de iniciar extensivamente el desenrollamiento de pT181. Además, el modelado molecular de PcrASpn en base a la estructura conocida de la helicasa PcrA de *B. stearothermophilus* (con la que también tiene un 50% de identidad), sólo fue posible con la región de la proteína donde se encuentran los motivos helicasa característicos (Figura 55). El resto, unos 100 residuos de la región C-terminal, quedó fuera del modelado y podría constituir uno o varios dominios, separados del núcleo central conservado de la helicasa, que proporcionarían funciones adicionales. Por tanto, las variaciones en la secuencia de aminoácidos de regiones diferentes a las que incluyen los motivos helicasa, podrían constituir un determinante de la especificidad en la interacción entre las helicasas PcrA y los iniciadores de la replicación RC.

En resumen, PcrASpn, al igual que otras helicasas PcrA caracterizadas hasta ahora (Anand *et al.*, 2004; Bird *et al.*, 1998a; Petit *et al.*, 1998), es capaz de iniciar el desenrollamiento del DNA cortado por RepC, aunque con una extensión limitada, probablemente a través de la interacción directa con el iniciador, propiciando la síntesis de la cadena líder por la intervención de otras proteínas del hospedador, como la proteína de unión a DNA de cadena sencilla (SsbA), la DNA polimerasa I (Díaz *et al.*, 1994), y la DNA polimerasa III. La utilización de un sistema reconstituido con proteínas purificadas implicadas en la replicación RC, podría proporcionar más información sobre el conjunto de interacciones proteína-proteína y proteína-DNA que suceden en el origen de replicación. Finalmente, resulta evidente la necesidad de realizar más experimentos para determinar hasta qué punto aspectos como la polaridad y la procesividad de las helicasas PcrA están implicados en la capacidad de un determinado hospedador Gram-positivo para permitir la replicación de una variedad de plásmidos RC. Estos experimentos consistirían en la construcción de proteínas PcrA quiméricas y en la generación de mutaciones puntuales en aquellas secuencias de aminoácidos de PcrA que son divergentes entre los distintos géneros bacterianos.

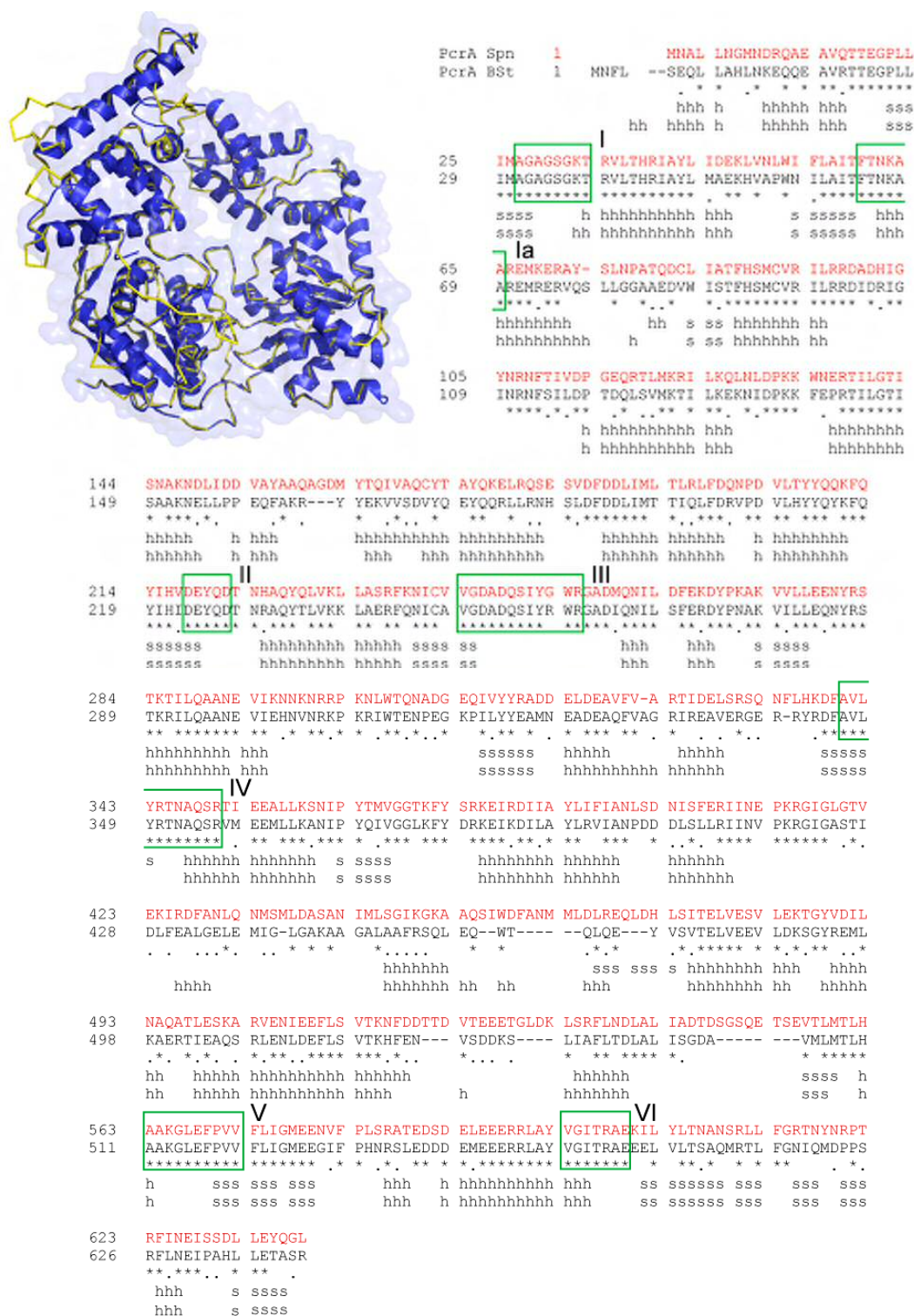


Figura 55. **Modelo de la estructura 3D de PcrASpn.** El modelado de la estructura de PcrASpn se realizó con el programa Swiss-Model por comparación con la estructura de PcrA de *B. stearothermophilus* (PcrABst). Este programa es capaz de generar el modelo cuando existe más de un 25 % de identidad de secuencia de aminoácidos. En la imagen se muestra una superposición de la estructura de PcrABst (cintas azules) con el modelo de la estructura de PcrASpn (línea amarilla). Además, se muestra la secuencia alineada de ambas proteínas que ha servido para generar el modelo. En la parte inferior se indica el elemento de estructura secundaria correspondiente (h: hélice α; s: cadena β). La secuencia de los motivos helicasa se indica con un recuadro verde.

CONCLUSIONES

Del trabajo realizado en esta Tesis, podemos extraer las siguientes conclusiones:

1. El *dso* de pMV158 está constituido por dos loci, *nic* y *bind*, separados entre sí por 84 bases. El locus *bind*, compuesto por tres repeticiones directas de 11 pb (DDR), es el sitio de unión primario de RepB en el *dso*. El locus *nic*, compuesto por la repetición invertida IR-I, con la secuencia específica de corte en la parte central, y las repeticiones PDR, constituye el sitio secundario de unión de RepB en el *dso*. RepB se une con mayor afinidad al locus *bind* que al *nic*. Además, los complejos que forma la proteína con su sitio primario son mucho más estables que los formados con el locus *nic*.
2. La unión del RepB al locus *bind* induce una curvatura en el DNA y su acortamiento. Sobre DNA lineal, RepB interacciona con el locus *bind* por una cara de la doble hélice dando lugar a un patrón de contactos con las bases, a través del surco mayor, que se repite en cada una de las DDR. Los contactos de RepB con el locus *bind* en DNA superenrollado son esencialmente los mismos que sobre DNA lineal.
3. La interacción de RepB con el locus *nic*, en DNA lineal, se establece con la secuencia situada a 3' del sitio de corte, que incluye el brazo derecho de IR-I y las PDR. Los contactos de RepB con el locus *nic* en DNA superenrollado, analizados sobre la cadena complementaria a la que contiene la secuencia de corte, mostraron que son diferentes a los observados en DNA lineal, aunque también incluyen regiones situadas a 3' del sitio de corte.
4. La unión de RepB al locus *bind* en DNA plasmídico superenrollado parece facilitar la unión de otro hexámero de proteína en el locus *nic*. Por su parte, la unión de RepB en el locus *nic* promueve la extrusión de la estructura cruciforme IR-I y permite la configuración monocatenaria de la secuencia específica de corte.
5. RepB sufre un cambio de conformación inducido por la temperatura entre 32 y 45 °C, que aumenta su contenido en hélices α y afecta, asimismo, a la estructura terciaria de la proteína. Este cambio conformacional inactiva la proteína, que pierde su actividad de corte y corte/cierre sobre DNA plasmídico y su capacidad de unión al DNA específico. La unión de Mn^{2+} o Co^{2+} aumenta significativamente la estabilidad térmica de RepB.
6. RepB permanece estable como hexámero en un amplio rango de concentraciones. Los experimentos de entrecruzamiento *in vivo* nos han permitido identificar el hexámero de RepB en el interior de las células de *S. pneumoniae* que portan el plásmido pMV158. Las formas hexaméricas de proteína parecen coexistir con las formas diméricas.

7. La estructura global del hexámero se caracteriza por una región C-terminal que forma un anillo hexamérico con simetría rotacional senaria. La estructura de la región N-terminal en el cristal trigonal de proteína se caracteriza por presentar una simetría rotacional binaria debido a la disposición de los dominios N-terminales de cada protómero, que forman dos trímeros enfrentados. En cada trímero, los dominios N-terminales presentan un cierto giro sobre sí mismos, efectuado sobre la región bisagra, de manera que forman una especie de semicírculo. Dentro de cada protómero de RepB se pueden identificar dos dominios, el dominio N-terminal presenta la actividad endonucleasa y de transferencia de cadena, mientras que la región C-terminal constituye el dominio de hexamerización.

8. El dominio N-terminal presenta el plegamiento característico de las proteínas de la superfamilia RCR, y está constituido por una lámina β central formada por cinco cadenas antiparalelas flanqueadas por dos hélices α a un lado, y por otras dos hélices α y una hélice 3_{10} por el otro.

9. El residuo catalítico Tyr99 está situado en la hélice α_3 , con una localización topológicamente conservada respecto al resto de estructuras conocidas de las clases Rep y Mob. El centro activo incluye un catión Mn^{2+} coordinado con una geometría octaédrica, donde intervienen tres residuos His (incluyendo los dos del motivo HUH), un residuo Asp y dos moléculas de agua. Además, el residuo catalítico Tyr99 participa en esta coordinación formando puente de hidrógeno con una de las moléculas de agua.

10. El análisis de las partículas de RepB unidas al DNA del locus *bind* mediante ME indica que la superficie de interacción con el DNA se encuentra en la región N-terminal del hexámero de RepB. Estos resultados son compatibles con el potencial electrostático positivo de la superficie de la región N-terminal de RepB, que favorecería la interacción inespecífica con el DNA.

11. El gen *pcrA* de *S. pneumoniae* se encuentra formando parte de un operón junto con el gen *radC*. La expresión de este operón, que está dirigida por el promotor Pa, es esencial.

12. La actividad ATPasa de PcrASpn está estimulada por la presencia de ssDNA. PcrA presenta mayor afinidad de unión por sustratos que contienen regiones de ssDNA con capacidad de formar estructuras tallo-lazo, que mimetizan las estructuras que se generarían en el *dso* plasmídico. Además, PcrA es capaz de desenrollar este tipo de sustratos con la región estructurada tanto en el extremo protuberante 3', como en el 5', es decir, presenta actividad helicasa bipolar.

13. PcrASpn puede interaccionar físicamente con RepC (el iniciador de la replicación de pT181). Sin embargo, PcrASpn no es capaz de iniciar *in vitro* el desenrollamiento extensivo del DNA de pT181 cortado por RepC. Además, y al contrario que la helicasa

PcrA de *S. aureus* (ortóloga), PcrASpn se mostró incapaz de promover la replicación de pT181. Por tanto, y a pesar de la interacción con RepC, la helicasa PcrASpn muestra una falta de procesividad en el desenrollamiento del DNA de pT181 en los sistemas *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

- Aki, T., and Adhya, S. (1997) Repressor induced site-specific binding of HU for transcriptional regulation. *EMBO J.* **16**: 3666-3674.
- Ali, J.A., and Lohman, T.M. (1997) Kinetic measurement of the step size of DNA unwinding by *Escherichia coli* UvrD helicase. *Science* **275**: 377-380.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Anand, S.P., and Khan, S.A. (2004) Structure-specific DNA binding and bipolar helicase activities of PcrA. *Nucl. Acids Res.* **32**: 3190-3197.
- Anand, S.P., Mitra, P., Naqvi, A., and Khan, S.A. (2004) *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* PcrA helicases can support DNA unwinding and in vitro rolling-circle replication of plasmid pT181 of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **186**: 2195-2199.
- Anand, S.P., Chattopadhyay, A., and Khan, S.A. (2005) The PcrA3 mutant binds DNA and interacts with the RepC initiator protein of plasmid pT181 but is defective in its DNA helicase and unwinding activities. *Plasmid* **54**: 104-113.
- Andrade, M.A., Chacón, P., Merelo, J.J., and Morán, F. (1993) Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism using an unsupervised learning neural network. *Prot. Eng.* **6**: 383-390.
- Asano, S., Higashitani, A., and Horiuchi, K. (1999) Filamentous phage replication initiator protein gpII forms a covalent complex with the 5' end of the nick it introduced. *Nucl. Acids Res.* **27**: 1882-1889.
- Backert, S., Meibner, K., and Borner, T. (1997) Unique features of the mitochondrial rolling circle-plasmid mp1 from the higher plant *Chenopodium album* (L.). *Nucl. Acids Res.* **25**: 582-589.
- Baker, T.A., and Wickner, S.H. (1992) Genetics and enzymology of DNA replication in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* **26**: 447-477.
- Ballester, S., López, P., Alonso, J.C., Espinosa, M., and Lacks, S.A. (1986) Selective advantage of deletions enhancing chloramphenicol acetyltransferase gene expression in *Streptococcus pneumoniae* plasmids. *Gene* **41**: 153-163.
- Belikov, S., and Wieslander, L. (1995) Express protocol for generating G+A sequencing ladders. *Nucl. Acids Res.*: 310.
- Bennett, R.J., Keck, J.L., and Wang, J.C. (1999) Binding specificity determines polarity of DNA unwinding by the Sgs1 protein of *S. cerevisiae*. *Journal of Molecular Biology* **289**: 235.
- Berns, K. (1990) Parvovirus replication. *Microbiol. Rev.* **54**: 316-329.
- Birboim, H.C., and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Birch, P., and Khan, S. (1992) Replication of single-stranded plasmid pT181 DNA *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 290-294.
- Bird, L., Brannigan, J., Subramanya, H., and Wigley, D. (1998a) Characterisation of *Bacillus stearothermophilus* PcrA helicase: evidence against an active rolling mechanism. *Nucl. Acids Res.* **26**: 2686-2693.
- Bird, L.E., Subramanya, S., and Wigley, D.B. (1998b) Helicases: a unifying structural theme? *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**: 14-18.
- Boer, R., Russi, S., Guasch, A., Lucas, M., Blanco, A.G., Pérez-Luque, R., Coll, M., and de la Cruz, F. (2006) Unveiling the molecular mechanism of a conjugative relaxase: the structure of TrwC complexed with a 27-mer DNA comprising the recognition hairpin and the cleavage site. *Journal of Molecular Biology* **358**: 857.
- Böhm, G., Muhr, R., and Jaenicke, R. (1992) Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng* **5**: 194-195.
- Bowater, R., Aboul-ela, F., and Lilley, D.M. (1991) Large-scale opening of supercoiled DNA in response to temperature and supercoiling in (A+T)-rich regions that promote low-salt cruciform extrusion. *Biochemistry* **30**: 11495-11506.

- Brantl, S. (1994) The *copR* gene product of plasmid pIP501 acts as a transcriptional repressor at the essential *repR* promoter. *Mol. Microbiol.* **14**: 473-483.
- Brantl, S., and Wagner, E.G.H. (1996) An unusually long-lived antisense RNA in plasmid copy number control: in vivo RNAs encoded by the streptococcal plasmid pIP501. *Journal of Molecular Biology* **255**: 275.
- Brendza, K.M., Cheng, W., Fischer, C.J., Chesnik, M.A., Niedziela-Majka, A., and Lohman, T.M. (2005) Autoinhibition of *Escherichia coli* Rep monomer helicase activity by its 2B subdomain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 10076-10081.
- Bruand, C., Ehrlich, S.D., and Janniere, L. (1991) Unidirectional replication of the structurally stable *Enterococcus faecalis* plasmid pAM β 1. *EMBO J* **10**: 2171-2177.
- Bruand, C., Le Chatelier, E., Ehrlich, S.D., and Janniere, L. (1993) A fourth class of theta replicating plasmid: the pAM β 1 family from Gram-positive bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 11668-11672.
- Bruand, C., and Ehrlich, S.D. (2000) UvrD-dependent replication of rolling-circle plasmids in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **35**: 204-210.
- Bruck, I., and O'Donnell, M. (2000) The DNA replication machine of a Gram-positive organism. *J. Biol. Chem.* **275**: 28971-28983.
- Burdett, V. (1980) Identification of tetracycline-resistant R-plasmids in *Streptococcus agalactiae* (group B). *Antimicrob. Agents Chemother.* **18**: 753-760.
- Campos-Olivas, R., Louis, J.M., Clerot, D., Gronenborn, B., and Gronenborn, A.M. (2002) The structure of a replication initiator unites diverse aspects of nucleic acid metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 10310-10315.
- Clérot, D., and Bernardi, F. (2006) DNA helicase activity is associated with the replication initiator protein Rep of tomato yellow leaf curl geminivirus. *J. Virol.*: 11322-11330.
- Cloutier, T.E., and Widom, J. (2005) DNA twisting flexibility and the formation of sharply looped protein-DNA complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 3645-3650.
- Cowan, J.A. (1998) Metal activation of enzymes in nucleic acid biochemistry. *Chem. Rev.* **98**: 1067-1088.
- Cox, M.M., Goodman, M.F., Kreuzer, K.N., Sherratt, D.J., Sandler, S.J., and Marians, K.J. (2000) The importance of repairing stalled replication forks. *Nature* **404**: 37-41.
- Craig, M.L., Tsodikov, O.V., McQuade, K.L., Schlax, P.E., Capp, M.W., Saecker, R.M., and Record, M.T. (1998) DNA footprints of the two kinetically significant intermediates in formation of an RNA polymerase-promoter open complex: evidence that interactions with start site and downstream DNA induce sequential conformational changes in polymerase and DNA. *Journal of Molecular Biology* **283**: 741.
- Chang, T.-L., Kramer, M.G., Ansari, R.A., and Khan, S.A. (2000) Role of individual monomers of a dimeric initiator protein in the initiation and termination of plasmid rolling circle replication. *J. Biol. Chem.* **275**: 13529-13534.
- Chang, T.-L., Naqvi, A., Anand, S.P., Kramer, M.G., Munshi, R., and Khan, S.A. (2002) Biochemical characterization of the *Staphylococcus aureus* PcrA helicase and its role in plasmid rolling circle replication. *J. Biol. Chem.* **277**: 45880-45886.
- Changela, A., DiGate, R.J., and Mondragon, A. (2001) Crystal structure of a complex of a type IA DNA topoisomerase with a single-stranded DNA molecule. *Nature* **411**: 1077.
- Chen, G., and Stenlund, A. (2002) Sequential and ordered assembly of E1 initiator complexes on the papillomavirus origin of DNA replication generates progressive structural changes related to melting. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 7712-7720.

- Cheng, W., Brendza, K.M., Gauss, G.H., Korolev, S., Waksman, G., and Lohman, T.M. (2002) The 2B domain of the *Escherichia coli* Rep protein is not required for DNA helicase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 16006-16011.
- Cheng, W., Hsieh, J., Brendza, K., and Lohman, T. (2001) *E. coli* Rep oligomers are required to initiate DNA unwinding in vitro. *J. Mol. Biol.* **310**: 327-350.
- Datta, S., Larkin, C., and Schildbach, J.F. (2003) Structural insights into single-stranded DNA binding and cleavage by F factor Tral. *Structure* **11**: 1369.
- de la Campa, A.G., del Solar, G., and Espinosa, M. (1990) Initiation of replication of plasmid pLS1. The initiator protein RepB acts on two distant regions. *J. Mol. Biol.* **213**: 247-262.
- del Solar, G., Díaz, R., and Espinosa, M. (1987) Replication of the streptococcal plasmid pMV158 and derivatives in cell-free extracts of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **206**: 428-435.
- del Solar, G., Moscoso, M., and Espinosa, M. (1993a) Rolling circle-replicating plasmids from gram-positive and -negative bacteria: a wall falls. *Mol. Microbiol.* **8**: 789-796.
- del Solar, G., Moscoso, M., and Espinosa, M. (1993b) *In vivo* definition of the functional origin of replication (ori(+)) of the promiscuous plasmid pLS1. *Mol. Gen. Genet.* **237**: 65-72.
- del Solar, G., Acebo, P., and Espinosa, M. (1995) Replication control of plasmid pLS1: efficient regulation of plasmid copy number is exerted by the combined action of two plasmid components, CopG and RNA II. *Mol. Microbiol.* **18**: 913-924.
- del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarría, M.J., Espinosa, M., and Díaz-Orejás, R. (1998) Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 434-464.
- del Solar, G.H., Pérez-Martín, J., and Espinosa, M. (1990) Plasmid pLS1-encoded RepA protein regulates transcription from *repAB* promoter by binding to a DNA sequence containing a 13-base pair symmetric element. *J. Biol. Chem.* **265**: 12569-12575.
- Dempsey, L., Birch, P., and Khan, S. (1992a) Uncoupling of the DNA topoisomerase and replication activities of an initiator protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 3083-3087.
- Dempsey, L.A., Birch, P., and Khan, S.A. (1992b) Six amino acids determine the sequence-specific DNA binding and replication specificity of the initiator proteins of the pT181 family. *J. Biol. Chem.* **267**: 24538-24543.
- Dempsey, L.A., Zhao, A.C., and Khan, S.A. (1995) Localization of the start sites of lagging-strand replication of rolling-circle plasmids from grampositive bacteria. *Mol. Microbiol.* **15**: 679-687.
- Díaz, A., Lacks, S.A., and López, P. (1994) Multiple roles for DNA polymerase I in establishment and replication of the promiscuous plasmid pLS1. *Mol. Microbiol.* **14**: 773-783.
- Dillingham, M.S., Wigley, D.B., and Webb, M.R. (2000) Unidirectional single-stranded DNA translocation by PcrA helicase: measurement of step size and translocation speed. *Biochemistry* **39**: 205-212.
- Dillingham, M.S., Spies, M., and Kowalczykowski, S.C. (2003) RecBCD enzyme is a bipolar DNA helicase. *Nature* **423**: 893.
- Dower, W.J., Miller, J.F., and W, R.C. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electrophoration. *Nucl. Acids Res.* **16**: 6127-6145.
- Enemark, E.J., Chen, G., Vaughn, D.E., Stenlund, A., and Joshua-Tor, L. (2000) Crystal structure of the DNA binding domain of the replication initiation protein E1 from papillomavirus. *Molecular Cell* **6**: 149.
- Enemark, E.J., and Joshua-Tor, L. (2006) Mechanism of DNA translocation in a replicative hexameric helicase. *Nature* **442**: 270.
- Espinosa, M., Cohen, S., Couturier, M., del Solar, G., Díaz-Orejás, R., Giraldo, R., Jánniere, L., Osborn, M., and Thomas, C.M. (2000) Plasmid replication and

- copy number control. In *The horizontal gene pool. Bacterial plasmids and gene spread*. Thomas, C.M. (ed). Amsterdam: Harwood Academic Publishers, pp. 1-48.
- Flores, M.-J., Sanchez, N., and Michel, B. (2005) A fork-clearing role for UvrD. *Molecular Microbiology* **57**: 1664-1675.
- Geanacopoulos, M., Vasmatzis, G., Zhurkin, V.B., and Adhya, S. (2001) Gal repressosome contains an antiparallel DNA loop. *Nature Struct. Biol.* **8**: 432-436.
- Gomis-Ruth FX, Sola M, Acebo P, Parraga A, Guasch A, Eritja R, Gonzalez A, Espinosa M, del Solar G, and M., C. (1998) The structure of plasmid-encoded transcriptional repressor CopG unliganded and bound to its operator. *EMBO J.* **17**: 7404-7415.
- Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Donchenko, A.P., and Blinov, V.M. (1989) Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucl. Acids Res.* **17**: 4713-4730.
- Gorbalenya, A.E., and Koonin, E.V. (1993) Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**: 419- 429.
- Gruss, A.D., and S. D. Ehrlich. (1989) The family of highly interrelated single-stranded deoxyribonucleic acid plasmids. *Microbiol. Rev.* **53**: 231-241.
- Guasch, A., Lucas, M., Moncalian, G., Cabezas, M., Pérez-Luque, R., Gomis-Ruth, F.X., de la Cruz, F., and Coll, M. (2003) Recognition and processing of the origin of transfer DNA by conjugative relaxase TrwC. *Nat Struct Mol Biol* **10**: 1002.
- Ha, T., Rasnik, I., Cheng, W., Babcock, G., Gauss, G., Lohman, T., and Chu, S. (2002) Initiation and re-initiation of DNA unwinding by the *Escherichia coli* Rep helicase. *Nature Struct. Biol.* **419**: 638-641.
- Hall, M.C., and Matson, S.W. (1999) Helicase motifs: the engine that powers DNA unwinding. *Mol. Microbiol.* **34**: 867-877.
- Hanahan, D. (1983) Studies in transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Hanai, R., and Wang, J.C. (1993) The mechanism of sequence-specific DNA cleavage and strand transfer by phi X174 gene A* protein. *J. Biol. Chem.* **268**: 23830-23836.
- Helinski, D.R., Toukdarian, A.E., and Novick, R.P. (1996) Replication control and other stable maintenance mechanism of plasmids. Neidhart (ed). Washington D. C.: American Society for Microbiology, pp. 2295-2324.
- Heller, R.C., and Marians, K.J. (2005) Unwinding of the nascent lagging strand by Rep and PriA enables the direct restart of stalled replication forks. *J. Biol. Chem.* **280**: 34143-34151.
- Hickman, A.B., Ronning, D.R., Kotin, R.M., and Dyda, F. (2002) Structural unity among viral origin binding proteins: crystal structure of the nuclease domain of adeno-associated virus Rep. *Molecular Cell* **10**: 327.
- Hickman, A.B., Ronning, D.R., Perez, Z.N., Kotin, R.M., and Dyda, F. (2004) The nuclease domain of adeno-associated virus Rep coordinates replication initiation using two distinct DNA recognition interfaces. *Molecular Cell* **13**: 403.
- Higgins, D., Thompson, J., Gibson, T., Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressively multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- Ilyina, T.V., and Koonin, E.V. (1992) Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eucaryotes, and archaebacteria. *Nucl. Acids Res.* **20**: 3279-3285.
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., and White, T.J.e. (1990) PCR protocols to methods and applications. *Academic Press, Inc., San Diego, CA*.

- Iordanescu, S., and Basheer, R. (1991) The *Staphylococcus aureus* mutation *pcrA3* leads to the accumulation of pT181 replication initiation complexes. *J. Mol. Biol.* **221**: 1183-1189.
- Iordanescu, S. (1993a) Plasmid pT181-linked suppressors of the *Staphylococcus aureus* *pcrA3* chromosomal mutation. *J. Bacteriol.* **175**: 3916-3917.
- Iordanescu, S. (1993b) Characterization of the *Staphylococcus aureus* chromosomal gene *pcrA*, identified by mutations affecting plasmid pT181 replication. *Mol. Gen. Genet.* **241**: 185-192.
- Itoh, T., and Horii, T. (1989) Replication of ColE2 and ColE3 plasmids: *in vitro* replication dependent on plasmid-coded proteins. *Mol. Gen. Genet.* **219**: 249-255.
- James, J.A., Escalante, C.R., Yoon-Roberts, M., Edwards, T.A., Linden, R.M., and Aggarwal, A.K. (2003) Crystal structure of the SF3 helicase from adeno-associated virus type 2. *Structure* **11**: 1025.
- Jin, R., Zhou, X., and Novick, R.P. (1996) The Inactive pT181 initiator heterodimer, RepC/C, binds but fails to induce melting of the plasmid replication origin. *J. Biol. Chem.* **271**: 31086-31091.
- Jin, R., Fernandez-Beros, M.-E., and Novick, R.P. (1997a) Why is the initiation nick site of an AT-rich rolling circle plasmid at the tip of a GC-rich cruciform? *EMBO J.* **16**: 4456-4466.
- Jin, R., Rasooly, A., and Novick, R.P. (1997b) *In vitro* inhibitory activity of RepC/C*, the inactivated form of the pT181 plasmid initiation protein, RepC. *J. Bacteriol.* **179**: 141-147.
- Jin, R., and Novick, R.P. (2001) Role of the double-strand origin cruciform in pT181 replication. *Plasmid* **46**: 95-105.
- Khan, S.A., and Novick, R.P. (1983) Complete nucleotide sequence of pT181, a tetracycline resistance plasmid from *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* **10**: 251-259.
- Khan, S.A. (2000) Plasmid rolling-circle replication: recent developments. *Mol. Microbiol.* **37**: 477-484.
- Khan, S.A. (2003) DNA-protein interactions during the initiation and termination of plasmid pT181 rolling-circle replication. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **75**: 113-137.
- Khan, S.A. (2005) Plasmid rolling-circle replication: highlights of two decades of research. *Plasmid* **53**: 126-136.
- Kiewiet, R., Bron, S., de Jonge, K., Venema, G., and Seegers, J.F.M.L. (1993) Theta replication of the lactococcal plasmid pWVO2. *Mol. Microbiol.* **10**: 319-327.
- Kim, K., Zwieb, C., Wu, C., and Adhya, S. (1989) Bending of DNA by gene-regulatory proteins: construction and use of a DNA bending vector. *Gene* **85**: 15-23.
- Kim, S.W., Jeong, E.J., Kang, H.S., Tak, J.I., Bang, W.Y., Heo, J.B., Jeong, J.Y., Yoon, G.M., Kang, H.Y., and Bahk, J.D. (2006) Role of RepB in the replication of plasmid pJB01 isolated from *Enterococcus faecium* JC1. *Plasmid* **55**: 99-113.
- Koepsel, R.R., Murray, R.W., Rosenblum, W.D., and Khan, S.A. (1985) The replication initiator protein of plasmid pT181 has sequence-specific endonuclease and topoisomerase-like activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 6845-6849.
- Koepsel, R.R., and Khan, S.A. (1986) Static and initiator protein-enhanced bending of DNA at a replication origin. *Science* **233**: 1316-1318.
- Koepsel, R.R., Murray, R.W., and Khan, S.A. (1986) Sequence-specific interaction between the replication initiator protein of plasmid pT181 and its origin of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 5484-5488.
- Koonin, E.V., and Ilyina, T.V. (1993) Computer-assisted dissection of rolling circle DNA replication. *BioSystems* **30**: 241-268.
- Kornberg, A., and Baker, T. (1992) *DNA Replication*, 2nd edn. New York, NY: W. H. Freeman and Co.

- Korolev, S., Hsieh, J., Gauss, G.H., Lohman, T.M., and Waksman, G. (1997) Major domain swiveling revealed by the crystal structures of complexes of *E. coli* Rep helicase bound to single-stranded DNA and ADP. *Cell* **90**: 635-647.
- Kowalczykowski, S.C. (2000) Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 156-165.
- Kramer, M.G., Khan, S.A., and Espinosa, M. (1998) Lagging-strand replication from the *ssoA* origin of plasmid pMV158 in *Streptococcus pneumoniae*: *in vivo* and *in vitro* influences of mutations in two conserved *ssoA* regions. *J. Bacteriol.* **180**: 83-89.
- Kreiswirth, B.N., S. Lofdahl, M.J., Betley, M., O'Reilly, P.M., Schlievert, M.S., and Bergdoll, a.R.P.N. (1983) The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. *Nature* **305**: 709-712.
- Krüger, R., Rakowski, A.A., and Filutowicz, M. (2004) Isomerization and apparent DNA bending by Pi, the replication protein of plasmid R6K. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **313**: 834-840.
- Kuusk, S., Sedman, T., Joers, P., and Sedman, J. (2005) Hmi1p from *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria is a structure-specific DNA helicase. *J. Biol. Chem.* **280**: 24322-24329.
- Lacks, S.A. (1966) Integration-efficiency and genetic recombination in pneumococcal transformation. *Genetics* **53**: 207-235.
- Lacks, S.A., and Greenberg, B. (1977) Complementary specificity of restriction endonucleases of *Diplococcus pneumoniae* with respect to DNA methylation. *J. Mol. Biol.* **114**: 153-168.
- Lacks, S.A., López, P., Greenberg, B., and Espinosa, M. (1986) Identification and analysis of genes for tetracycline resistance and replication functions in the broad-host-range plasmid pLS1. *J. Mol. Biol.* **192**: 753-765.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Larkin, C., Datta, S., Harley, M.J., Anderson, B.J., Ebie, A., Hargreaves, V., and Schildbach, J.F. (2005) Inter- and intramolecular determinants of the specificity of single-stranded DNA binding and cleavage by the F factor relaxase. *Structure* **13**: 1533.
- Laue, T.M., Shah, B.D., Ridgeway, T.M., and Pelletier, S.L. (1992) Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins. In *Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Sciences*. Harding, S.E., Rowe, A. and Horton, J.C. (eds). Cambridge: Royal Society of Chemistry, pp. 90-125.
- Le Chatelier, E., Ehrlich, S.D., and Janniere, L. (1996) Countertranscript-driven attenuation system of the pAM beta 1 repE gene. *Mol. Microbiol.* **20**: 1099-1112.
- Lee, J.Y., and Yang, W. (2006) UvrD helicase unwinds DNA one base pair at a time by a two-part power stroke. *Cell* **127**: 1349.
- Lewis, D.E.A., and Adhya, S. (2004) Axiom of determining transcription start points by RNA polymerase in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **54**: 692-701.
- Li, D., Zhao, R., Lilyestrom, W., Gai, D., Zhang, R., DeCaprio, J.A., Fanning, E., Jochimiak, A., Szakonyi, G., and Chen, X.S. (2003) Structure of the replicative helicase of the oncoprotein SV40 large tumour antigen. *Nature* **423**: 512.
- Lohman, T.M., and Bjornson, K.P. (1996) Mechanisms of helicase-catalyzed DNA unwinding. *Annu. Rev. Biochem.* **65**: 169-214.
- Lombardo, M.-J., and Rosenberg, S.M. (2000) *radC102* of *Escherichia coli* is an allele of *recG*. *J. Bacteriol.* **182**: 6287-6291.
- López, P., Espinosa, M., Stassi, D.L., and Lacks, S.A. (1982) Facilitation of plasmid transfer in *Streptococcus pneumoniae* by chromosomal homology. *J. Bacteriol.* **150**: 692-701.
- Ludtke, S.J., Baldwin, P.R., and Chiu, W. (1999) EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. *J. Struct. Biol.* **128**: 82-97.

- Luo, X., Sanford, D., G., Bullock, P.A., and Bachovchin, W.W. (1996) Solution structure of the origin DNA-binding domain of SV40 T-antigen. *Nat Struct Biol* **12**: 1034-1039.
- Llosa, M., Grandoso, G., Hernando, M.A., and de la Cruz, F. (1996) Functional domains in protein TrwC of plasmid R388: dissected DNA strand transferase and DNA helicase activities reconstitute protein function. *Journal of Molecular Biology* **264**: 56.
- Mahdi, A.A., Buckman, C., Harris, L., and Lloyd, R.G. (2006) Rep and PriA helicase activities prevent RecA from provoking unnecessary recombination during replication fork repair. *Genes Dev.* **20**: 2135-2147.
- Maluf, N., Fischer, C., and Lohman, T. (2003) A dimer of *E.coli* UvrD is the active form of the helicase *in vitro*. *J. Mol. Biol.* **325**: 913-935.
- Man, T.-K., and Stormo, G.D. (2001) Non-independence of Mnt repressor-operator interaction determined by a new quantitative multiple fluorescence relative affinity (QuMFRA) assay. *Nucl. Acids Res.* **29**: 2471-2478.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982) Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.*
- Marians, K.J. (1992) Prokaryotic DNA replication. *Ann. Rev. Biochem.* **61**: 673-719.
- Marians, K.J. (2000) Crawling and wiggling on DNA: structural insights to the mechanism of DNA unwinding by helicases. *Structure* **8**: R227-R235.
- Marshak, D.R., Kadonaga, J.T., Burgess, R.R., Knuth, M.W., Brennan, W.A., and Lin, S.-H. (1996) Strategies for protein purification and characterization. A laboratory course manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press.*
- Marsin, S., and Forterre, P. (1999) The active site of the rolling circle replication protein Rep75 is involved in site-specific nuclease, ligase and nucleotidyl transferase activities. *Molecular Microbiology* **33**: 537-545.
- Maxam, A.H., and Gilbert, W. (1980) Sequencing end-labelled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol* **65**.
- McCluskey, J., Hinds, J., Husain, S., Witney, A., and Mitchell, T.J. (2004) A two-component system that controls the expression of pneumococcal surface antigen A (PsaA) and regulates virulence and resistance to oxidative stress in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **51**: 1661-1675.
- Meijer, W.J.J., de Boer, A.J., van Tongeren, S., Venema, G., and Bron, S. (1995) Characterization of the replication region of the *Bacillus subtilis* plasmid pLS20: a novel type of replicon. *Nucleic Acids Res.* **23**: 3214-3223.
- Miller, J.H. (1972) Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.*
- Minton, A.P. (1994) Conservation of signal: a new algorithm for the elimination of the reference concentration as an independently variable parameter in the analysis of the sedimentation equilibrium. In *Analytical Ultracentrifugation*. Schuster, T.M. and Laue, T.M. (eds). Boston: Birckhouser, pp. 81-93.
- Mohaghegh, P., Karow, J.K., Brosh, R.M., Jr., Bohr, V.A., and Hickson, I.D. (2001) The Bloom's and Werner's syndrome proteins are DNA structure-specific helicases. *Nucl. Acids Res.* **29**: 2843-2849.
- Morimatsu, K., and Kowalczykowski, S.C. (2003) RecFOR proteins load RecA protein onto gapped DNA to accelerate DNA strand exchange: a universal step of recombinational repair. *Molecular Cell* **11**: 1337.
- Moscoso, M., del Solar, G., and Espinosa, M. (1995a) Specific nicking-closing activity of the initiator of replication protein RepB of plasmid pMV158 on supercoiled or single-stranded DNA. *J. Biol. Chem.* **270**: 3772-3779.
- Moscoso, M., del Solar, G., and Espinosa, M. (1995b) *In vitro* recognition of the replication origin of pLS1 and of plasmids of the pLS1 family by the RepB initiator protein. *J. Bacteriol.* **177**: 7041-7049.
- Moscoso, M. (1996) Interacción entre la proteína RepB y el origen de replicación de pLS1. *Tesis Doctoral. Universidad Complutense.*

- Moscoso, M., Eritja, R., and Espinosa, M. (1997) Initiation of replication of plasmid pMV158: mechanisms of DNA strand-transfer reactions mediated by the initiator RepB protein. *Journal of Molecular Biology* **268**: 840.
- Müller, A.K., Rojo, F., and Alonso, J.C. (1995) The level of the pUB110 replication initiator protein is autoregulated, which provides an additional control for plasmid copy number. *Nucl. Acids Res.* **23**: 1894-1900.
- Neuwald, A.F., Aravind, L., Spouge, J.L., and Koonin, E.V. (1999) AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res.* **9**: 27-43.
- Nieto, C., Fernández de Palencia, P., López, P., and Espinosa, M. (2000) Construction of a tightly regulated plasmid vector for *Streptococcus pneumoniae*: controlled expression of the green fluorescent protein. *Plasmid* **43**: 205.
- Noirot-Gros, M.-F., Bidnenko, V., and Ehrlich, S.D. (1994) Active site of the replication protein of the rolling circle plasmid pC194. *EMBO J.* **13**: 4412-4420.
- Noirot-Gros, M.-F., and Ehrlich, S.D. (1996) Change of a catalytic reaction carried out by a DNA replication protein. *Science* **274**: 777-780.
- Noirot, P., Bargonetti, J., and Novick, R. (1990) Initiation of rolling-circle replication in pT181 plasmid: initiator protein enhances cruciform extrusion at the origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 8560-8564.
- Novick, R.P. (1987) Plasmid incompatibility. *Microbiol. Rev.* **51**: 381-395.
- Novick, R.P. (1989) Staphylococcal plasmids and their replication. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**: 537-565.
- Novick, R.P. (1998) Contrasting lifestyles of rolling-circle phages and plasmids. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 434-438.
- Orozco, B.M., Miller, A.B., Settlage, S.B., and Hanley-Bowdoin, L. (1997) Functional domains of a geminivirus replication protein. *J. Biol. Chem.* **272**: 9840-9846.
- Osborn, M. (2002) Database of plasmid replicons: http://www.essex.ac.uk/bs/staff/osborn/DPR_home.htm.
- Pansegrau, W., and Lanka, E. (1991) Common sequence motifs in DNA relaxases and nick regions from a variety of DNA transfer systems. *Nucl. Acids Res.* **19**: 3455.
- Papavassiliou, A.G. (1993) Localisation of DNA-protein contact points by DMS resistance of complexes resolved in gel retardation assays. *Nucl. Acids Res.* **21**: 757-758.
- Pearson, W.R., and Lipman, D.J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 2444-2448.
- Pérez-Martín, J., del Solar, G., de la Campa, A.G., and Espinosa, M. (1988) Three regions in the DNA of plasmid pLS1 show sequence-directed static bending. *Nucl. Acids Res.* **16**: 9113-9126.
- Pessen, H., and Kumosinsky, T.F. (1985) Measurement of protein hydration by various techniques. *Methods in Enzymol.* **117**: 219-255.
- Petit, M.-A., Dervyn, E., Rose, M., Entian, K.-D., McGovern, S., Ehrlich, S.D., and Bruand, C. (1998) PcrA is an essential DNA helicase of *Bacillus subtilis* fulfilling functions both in repair and rolling-circle replication. *Mol. Microbiol.* **29**: 261-273.
- Petit, M.-A., and Ehrlich, D. (2002) Essential bacterial helicases that counteract the toxicity of recombination proteins. *EMBO J.* **21**: 3137-3147.
- Polard, P., Marsin, S., McGovern, S., Velten, M., Wigley, D.B., Ehrlich, S.D., and Bruand, C. (2002) Restart of DNA replication in Gram-positive bacteria: functional characterisation of the *Bacillus subtilis* PriA initiator. *Nucl. Acids Res.* **30**: 1593-1605.
- Priebe, S.D., and Lacks, S.A. (1989) Region of the streptococcal plasmid pMV158 required for conjugative mobilization. *J. Bacteriol.* **171**: 4778-4784.
- Provencher, S.W., and Glockner, J. (1981) Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* **20**: 33-37.

- Pruitt, K.D., Tatusova, T., and Maglott, D.R. (2005) NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucl. Acids Res.* **33**: D501-504.
- Puyet, A., del Solar, G., and Espinosa, M. (1988) Identification of the origin and direction of replication of the broad-host-range plasmid pLS1. *Nucl. Acids Res.* **16**: 115-133.
- Puyet, A., Ibáñez, A., and Espinosa, M. (1993) Characterization of the *Streptococcus pneumoniae* maltosaccharide regulator MalR, a member of the LacI-GalR family of repressors displaying distinctive genetic features. *J. Biol. Chem.* **268**: 25402-25408.
- Rasooly, A., and Novick, R.P. (1993) Replication-specific inactivation of the pT181 plasmid initiator protein. *Science* **262**: 1048-1050.
- Rasooly, A., Wang, P., and Novick, R. (1994) Replication-specific conversion of the *Staphylococcus aureus* pT181 initiator protein from an active homodimer to an inactive heterodimer. *EMBO J.* **13**: 5245-5251.
- Roman, L.J., and Kowalczykowski, S.C. (1989) Characterization of the helicase activity of the *Escherichia coli* RecBCD enzyme using a novel helicase assay. *Biochemistry* **28**: 2863-2873.
- Ruiz-Masó, J.A., López-Zumel, C., Menéndez, M., Espinosa, M., and del Solar, G. (2004) Structural features of the initiator of replication protein RepB encoded by the promiscuous plasmid pMV158. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* **1696**: 113-119.
- Sabelnikov, A.G., Greenberg, B., and Lacks, S.A. (1995) An extended -10 promoter alone directs transcription of the *DpnII* operon of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Mol. Biol.* **250**: 144-155.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.*
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Sasse-Dwight, S., and Gralla, J.D. (1991) Footprinting protein-DNA complexes *in Vivo*. *Methods Enzymol* **208**: 146-168.
- Scherzinger, E., Haring, V., Lurz, R., and Otto, S. (1991) Plasmid RSF1010 DNA replication *in vitro* promoted by purified RSF1010 RepA, RepB and RepC proteins. *Nucl. Acids Res.* **19**: 1203-1211.
- Schlag, P.J., Capp, M.W., and Record, M.T. (1995) Inhibition of transcription initiation by lac repressor. *J. Mol. Biol.* **245**: 331-350.
- Schleif, R. (1992) DNA looping. *Annu. Rev. Biochem.* **61**: 199-223.
- Schuck, P., and Rossmanith, P. (2000) Determination of the sedimentation coefficient distribution by least-squares boundary modeling. *Biopolymers* **54**: 328-341.
- Schuck, S., and Stenlund, A. (2005) Assembly of a double hexameric helicase. *Molecular Cell* **20**: 377.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., and Peitsch, M.C. (2003) SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucl. Acids Res.* **31**: 3381-3385.
- Semsey, S., Tolstorukov, M.Y., Virnik, K., Zhurkin, V.B., and Adhya, S. (2004) DNA trajectory in the Gal repressosome. *Genes Dev.* **18**: 1898-1907.
- Senear, D.F., and Brenowitz, M. (1991) Determination of binding constants for cooperative site-specific protein-DNA interactions using the gel mobility-shift assay. *J. Biol. Chem.* **266**: 13661-13671.
- Serrano-Heras, G., Salas, M., and Bravo, A. (2003) *In vivo* assembly of Phage ϕ 29 replication protein p1 into membrane-associated multimeric structures. *J. Biol. Chem.* **278**: 40771-40777.
- Shaw, P.E., and Stewart, F. (1994) Identification of protein-DNA contacts with dimethyl sulfate. In *DNA-Protein Interactions: Principles and Protocols*. Vol. 30. Kneale, G.G. (ed). Totowa, NJ: Humana Press Inc., pp. 79-87.

- Shiratori A, Shibata T, Arisawa M, Hanaoka F, Murakami Y, and T., E. (1999) Systematic identification, classification, and characterization of the open reading frames which encode novel helicase-related proteins in *Saccharomyces cerevisiae* by gene disruption and Northern analysis. *Yeast* **15**: 219-253.
- Sikora, B., Eoff, R.L., Matson, S.W., and Raney, K.D. (2006) DNA unwinding by *Escherichia coli* DNA helicase I (Tral) provides evidence for a processive monomeric molecular motor. *J. Biol. Chem.* **281**: 36110-36116.
- Simonian, M.H. (2001) Spectrophotometric determination of protein concentration. *En Current Protocols in Protein Science (Coligan, J. E., Dunn, B. M., Ploegh, B. M., Speicher, D. W., Wingfield, P. T., Eds.)* **3.1.1-3.1.7**, John Wiley and Sons, Inc.
- Song, J.-H., and Kwan Soo Ko, J.-Y.L., Jin Yang Baek, Won Sup Oh, Ha Sik Yoon, Jin-Yong Jeong and Jongsik Chun (2005) Identification of essential genes in *Streptococcus pneumoniae* by allelic replacement mutagenesis. *Molecules and Cells* **19**: 365-374.
- Sorzano, C.O., Marabini, R., Velazquez-Muriel, J., Bilbao-Castro, J.R., Scheres, S.H., Carazo, J.M., and, and Pascual-Montano, A. (2004) XMIPP: a new generation of an open-source image processing package for electron microscopy. *J. Struct. Biol.* **148**: 194-204.
- Soultanas, P., Dillingham, M., and Wigley, D. (1998) *Escherichia coli* ribosomal protein L3 stimulates the helicase activity of the *Bacillus stearothermophilus* PcrA helicase. *Nucl. Acids Res.* **26**: 2374-2379.
- Soultanas, P., Dillingham, M., Papadopoulos, F., Phillips, S., Thomas, C., and Wigley, D. (1999) Plasmid replication initiator protein RepD increases the processivity of PcrA DNA helicase. *Nucl. Acids Res.* **27**: 1421-1428.
- Soultanas, P., Dillingham, M.S., Wiley, P., Webb, M.R., and Wigley, D.B. (2000) Uncoupling DNA translocation and helicase activity in PcrA: direct evidence for an active mechanism. *EMBO J.* **19**: 3799-3810.
- Spiess, E., and Lurz, R. (1988) Electron microscopic analysis of nucleic acids and nucleic acid-protein complexes. *Methods Microbiol* **20**: 293-323.
- Sreerama, N., and Woody, R.W. (2000) Estimation of protein secondary structure from CD spectra: Comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.* **287**: 252- 260.
- Stassi, D.L., López, P., Espinosa, M., and Lacks, S.A. (1981) Cloning of chromosomal genes in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 7028-7032.
- Stern, J.C., and Schildbach, J.F. (2001) DNA recognition by F Factor Tral36: highly sequence-specific binding of single-stranded DNA. *Biochemistry* **40**: 11586-11595.
- Story, R.M., and Steitz, T.A. (1992) The structure of the *E. coli* RecA protein monomer and polymer. *Nature* **255**: 318-325.
- Studier, F.W., and Moffat, B.A. (1986) Selective expression of cloned genes directed by T7 RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **189**: 113-130.
- Subramanya, H.S., Bird, L.E., Brannigan, J.A., and Wigley, D.B. (1996) Crystal structure of a DExx box DNA helicase. *Nature* **384**: 379-383.
- Swigon, D., Coleman, B.D., and Olson, W.K. (2006) Modeling the Lac repressor-operator assembly: The influence of DNA looping on Lac repressor conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 9879-9884.
- Takahashi, S., Hours, C., Iwaya, M., Lane, H.E.D., and Denhardt, D.T. (1978) The *Escherichia coli* rep gene in the single-stranded DNA phages. *Denhardt, D.T., Dressler, D.H., and Ray, D.S. (eds). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press*: 393-400.
- Takechi, S., and Itoh, T. (1995) Initiation of unidirectional ColE2 DNA replication by a unique priming mechanism. *Nucl. Acids Res.* **23**: 4196-4201.
- Takechi, S., Matsui, H., and Itoh, T. (1995) Primer RNA synthesis by plasmid-specific Rep protein for initiation of ColE2 DNA replication. *EMBO J* **14**: 5141-5147.

- Tatusova, T.A., Karsch-Mizrachi, I., and Ostell, J.A. (1999) Complete genomes in WWW Entrez: data representation and analysis. *Bioinformatics* **15**: 536-543.
- Taucher-Scholtz, G., Abdel-Monem, M., and Hoffman-Berling, H. (1983) Functions of DNA helicases in *Escherichia coli*. In mechanism of DNA replication and recombination. Cozzarelli, N.R. (ed.). New York, NY: A. R. Liss: 65±76.
- te Riele, H., B. Michel, and Ehrlich., S.D. (1986) Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 2541-2545.
- Thanassi, J.A., Hartman-Neumann, S.L., Dougherty, T.J., Dougherty, B.A., and Pucci, M.J. (2002) Identification of 113 conserved essential genes using a high-throughput gene disruption system in *Streptococcus pneumoniae*. *Nucl. Acids Res.* **30**: 3152-3162.
- Thomas, C.D., Balson, D.F., and Shaw, W. (1988) Identification of the tyrosine residue involved in bond formation between replication origin and the initiator protein of plasmid pC221. *Biochem. Soc. Trans.* **16**: 758-759.
- Thomas, C.D., Balson, D.F., and Shaw, W. (1990) *In vitro* studies of the initiation of staphylococcal plasmid replication. Specificity of RepD for its origin (oriD) and characterization of the Rep-ori tyrosil ester. *J. Biol. Chem* **265**: 5519-5530.
- Thomas, C.D., Nikiforov, T.T., Connolly, B.A., and Shaw, W.V. (1995) Determination of sequence specificity between a plasmid replication initiator protein and the origin of replication. *J. Mol. Biol.* **254**: 381-391.
- Thompson, J.F., and Landy, A. (1988) Empirical estimation of protein-induced DNA bending angles: applications to I site-specific recombination complexes. *Nucl. Acids Res.* **16**: 9687-9705.
- van Holde, K.E. (1985) *Physical Biochemistry*. Englewood Cliffs: Prentice-Hall.
- van Mansfeld, A.D.M., van Teeffelen, H.A.A.M., Bass, P.D., and Jansz, H.S. (1986) Two juxtaposed tyrosyl-OH groups participate in Φ X174 gene A protein catalysed cleavage and ligation of DNA. *Nucl. Acids Res.* **14**: 4229-4238.
- Veaute, X., Delmas, S., Selva, M., Jeusset, J., Le Cam, E., Matic, I., Fabre, F., and Petit, M.-A. (2005) UvrD helicase, unlike Rep helicase, dismantles RecA nucleoprotein filaments in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **24**: 180-189.
- Velankar, S.S., Soutanas, P., Dillingham, M.S., Subramanya, H.S., and Wigley, D.B. (1999) Crystal structures of complexes of PcrA DNA helicase with a DNA substrate indicate an inchworm mechanism. *Cell* **97**: 75-84.
- Waksman, G., Lanka, E., and Carazo, J. (2000) Helicases as nucleic acid unwinding machines. *Nat. Struct. Biol.* **7**: 20-22.
- Walker, E., Saraste, M., Runswick, M.J., and Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1**: 945-951.
- Wang, P.-Z., Projan, S.J., Henriquez, V., and Novick, R.P. (1992) Specificity of origin recognition by replication initiator protein in plasmids of the pT181 family is determined by a six amino acid residue element. *J. Mol. Biol.* **223**: 145-158.
- Wang, P.-Z., Projan, S.J., Henriquez, V., and Novick, R.P. (1993) Origin recognition specificity in pT181 plasmid is determined by a functionally asymmetric palindromic DNA element. *EMBO J.* **12**: 45-52.
- Waters, V.L., and Guiney, D.G. (1993) Processes at the nick region link conjugation, T-DNA transfer and rolling circle replication. *Mol. Microbiol.* **9**: 1123-1130.
- Wu, H.M., and Crothers, D.M. (1984) The locus of sequence-directed and protein-induced DNA bending. *Nature* **308**: 509-513.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.

- Yasueda, H., Takechi, S., Sugiyama, T., and Itoh, T. (1994) Control of ColE2 plasmid replication: negative regulation of the expression of the plasmid-specified initiator protein, Rep, at a posttranscriptional step. *Mol. Gen. Genet.* **244**: 41-48.
- Yasukawa, H., Hase, T., Sakai, A., and Masamune, Y. (1991) Rolling-circle replication of the plasmid pKYM isolated from a Gram-negative bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 10282-10286.
- Zhao, A.C., Ansari, R.A., Schmidt, M.C., and Khan, S.A. (1998) An oligonucleotide inhibits oligomerization of a rolling circle initiator protein at the pT181 origin of replication. *J. Biol. Chem.* **273**: 16082-16089.